



**HAL**  
open science

# Pertinence de l'utilisation de cartes FTA® pour l'envoi de prélèvements permettant le diagnostic de maladies respiratoires chez les bovins

Clémence Roux

► **To cite this version:**

Clémence Roux. Pertinence de l'utilisation de cartes FTA® pour l'envoi de prélèvements permettant le diagnostic de maladies respiratoires chez les bovins. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04168518

**HAL Id: dumas-04168518**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04168518v1>

Submitted on 21 Jul 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

Année 2023

**PERTINENCE DE L'UTILISATION DE CARTES FTA POUR  
L'ENVOI DE PRÉLÈVEMENTS PERMETTANT LE  
DIAGNOSTIC DE MALADIES RESPIRATOIRES CHEZ LES  
BOVINS**

**THÈSE**

pour obtenir le diplôme d'État de  
**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**  
présentée et soutenue publiquement devant  
la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)  
le 29 juin 2023

par

**Clémence, Marie, Maud ROUX**

sous la direction de

**Yves MILLEMANN**

**JURY**

<b>Présidente du jury :</b>	<b>Mme Sophie LE PODER</b>	Professeure à l'EnvA
<b>Directeur de thèse :</b>	<b>M. Yves MILLEMANN</b>	Professeur à l'EnvA
<b>Examinatrice :</b>	<b>Mme Bénédicte GRIMARD-BALLIF</b>	Professeure à l'EnvA
<b>Membres invités :</b>	<b>Mme Camille LEVESQUE</b>	Vétérinaire / Chef de service immunologie/virologie PCR Labocea Fougère (35)
	<b>Mme Stéphanie BERNHEIM</b>	Responsable Vétérinaire National Spécialisé Ruminants, Zoetis France



Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



version janvier 2023

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigé	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guénec	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Amé	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Benchekroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Falvre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuilliers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Mauffré	Vincent	Maître de conférences	DPASP
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtinet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC



# Remerciements

**À la Présidente du Jury de cette thèse, Mme Sophie LE PODER, Professeure à l'EnvA,**  
Sincères remerciements pour avoir accepté la présidence de cette thèse et pour vos corrections.

**À M. Yves MILLEMANN, Directeur de Thèse, Professeur à l'EnvA,**  
Mes remerciements chaleureux pour votre encadrement tout au long de ce projet, pour l'ensemble de vos conseils et de vos corrections, mais aussi pour votre bonne humeur sans faille me permettant ainsi d'aboutir à ce travail.

**À Mme Bénédicte GRIMARD-BALLIF, Professeure à l'EnvA,**  
Un grand merci d'avoir accepté d'appartenir à ce jury.

**À Mme Stéphanie BERNHEIM, Responsable Vétérinaire National Spécialisé Ruminants, Zoetis France,**  
Merci de m'avoir fait confiance pour m'avoir confié ce sujet et merci pour les financements ayant permis à cette étude d'exister.

**À Mme Camille LEVESQUE, Vétérinaire Chef de service immunologie/virologie PCR, et à toute l'équipe d'immunologie et de virologie du laboratoire Laboceva de Fougère**  
Un grand merci pour votre accueil au sein du laboratoire de Fougère et pour toutes vos explications.

**À l'ensemble des personnes ayant contribué à ma formation et plus particulièrement au Dr Patrick BUE, à Isabelle BUE, au Dr Sophie DUCROUT, au Dr Olivier DODET, au Dr Émilie GEOFFROY, à toute l'équipe de la clinique vétérinaire du Mesly, au Dr Mélanie GITTON, à toute l'équipe de la clinique vétérinaire des Ducs de Guise et à toute l'équipe de la clinique vétérinaire de Marolles,**  
Merci de m'avoir donné le goût et la passion pour ce métier qui, enfin, me tend les bras.

**À ma famille et à mes amis proches,**  
Merci pour tous les moments passés à vos côtés qui ont aussi contribué à être la personne que je suis aujourd'hui.

**À ma Mère et ma Sœur,**  
Merci d'être les personnes que vous êtes, merci pour votre soutien et votre aide.

**À Quentin,**  
Merci pour ton soutien depuis maintenant bientôt 9 ans et pour, je l'espère, de nombreuses années encore.

**À toi, Papa,**  
Qui, je le sais, aurait déjà commencé à verser des larmes dès la lecture de ces premiers mots.  
Tu nous manques.









# Table des matières

Liste des figures .....	13
Liste des tableaux.....	15
Liste des abréviations .....	19
Introduction.....	21
<b>Première partie : Bibliographie : Pathologie respiratoire chez les bovins : physiopathologie, prélèvements et mise en pratique en milieu rural .....</b>	<b>23</b>
1. Pathologie respiratoire chez les bovins : principaux agents pathogènes responsables et physiopathologie associée .....	23
1.1 <i>Particularités anatomiques de l'appareil respiratoire des bovins et prédispositions aux maladies respiratoires</i> .....	23
1.2 <i>Principaux agents pathogènes responsables des maladies respiratoires chez les bovins et physiopathologie associée</i> .....	24
1.2.1 Agents pathogènes respiratoires viraux.....	24
1.2.1.1 Rhinotrachéite Infectieuse Bovine (IBR) .....	24
1.2.1.1.1 Caractéristiques du virus .....	24
1.2.1.1.2 Physiopathologie .....	25
1.2.1.1.3 Épidémiologie .....	27
1.2.1.1.4 Signes cliniques.....	27
1.2.1.1.5 Diagnostic .....	28
1.2.1.1.6 Bilan.....	29
1.2.1.2 Virus Parainfluenza de type 3 (PI-3) .....	29
1.2.1.2.1 Caractéristiques du virus .....	29
1.2.1.2.2 Physiopathologie .....	30
1.2.1.2.3 Épidémiologie .....	31
1.2.1.2.4 Signes cliniques.....	31
1.2.1.2.5 Diagnostic .....	32
1.2.1.2.6 Bilan.....	32
1.2.1.3 Diarrhée Virale Bovine (BVD).....	33
1.2.1.3.1 Caractéristiques du virus .....	33
1.2.1.3.2 Physiopathologie .....	34
1.2.1.3.3 Épidémiologie .....	35
1.2.1.3.4 Signes cliniques.....	36
1.2.1.3.5 Diagnostic .....	37
1.2.1.3.6 Bilan.....	40
1.2.1.4 Virus Respiratoire Syncytial Bovin (VRS).....	41
1.2.1.4.1 Caractéristiques du virus .....	41
1.2.1.4.2 Physiopathologie .....	42
1.2.1.4.3 Épidémiologie .....	42
1.2.1.4.4 Signes cliniques.....	43
1.2.1.4.5 Diagnostic .....	43
1.2.1.4.6 Bilan.....	44
1.2.1.5 Coronavirus Bovin (BCoV) .....	44
1.2.1.5.1 Caractéristiques du virus .....	44
1.2.1.5.2 Physiopathologie .....	45
1.2.1.5.3 Épidémiologie .....	46
1.2.1.5.4 Signes cliniques.....	46
1.2.1.5.5 Diagnostic .....	46
1.2.1.5.6 Bilan.....	47
1.2.2 Agents pathogènes respiratoires bactériens .....	47
1.2.2.1 Pasteurelles pulmonaires .....	47
1.2.2.2 Mycoplasmes : <i>Mycoplasma bovis</i> .....	51
1.2.3 Agents pathogènes respiratoires parasitaires : dictyocaulose .....	53
1.3.1 Facteurs prédisposant aux maladies respiratoires chez les bovins .....	56
1.3.2 Facteurs environnementaux favorisant l'apparition de maladies respiratoires chez les bovins .....	57

2. Les différents prélèvements réalisés lors d'affection respiratoire chez les bovins et pertinence de leur utilisation en fonction des signes cliniques observés.....	58
2.1 Les différents prélèvements réalisés lors d'affection de l'appareil respiratoire chez les bovins.....	58
2.1.1 L'écouvillonnage Nasal Profond.....	58
2.1.2 L'Aspiration Trans-Trachéale.....	59
2.1.3 Le Lavage Broncho-Alvéolaire.....	61
2.1.4 Le prélèvement de poumon.....	62
2.1.5 Bilan.....	63
2.2. Indications de ces prélèvements : dans quelles circonstances choisir quel prélèvement.....	64
2.3. Problématiques de la pratique en milieu rural et de la réalisation, du conditionnement et de l'envoi de ces prélèvements.....	66
<b>Deuxième partie : Évaluation de l'effet du vieillissement des échantillons de type ENP et carte FTA® sur les performances des tests de détection de <i>Mannheimia haemolytica</i> et du Virus Respiratoire Syncytial Bovin par PCR.....</b>	<b>67</b>
1. Introduction.....	67
2. Matériels et méthodes.....	68
2.1 Calibrage de la solution de Mh et VRS utilisée pour l'expérience.....	68
2.2. Réalisation des échantillons.....	68
2.2.1. Réalisation des écouvillons.....	69
2.2.2. Réalisation des cartes FTA®.....	70
2.2.3. Remarques sur la réalisation des cartes FTA®.....	71
2.3. Analyse à J0, J7 et J14 des échantillons.....	71
2.3.1. Préparation des échantillons.....	71
❖ Préparation des écouvillons.....	71
❖ Préparation des cartes FTA®.....	72
2.3.2. Lyse des échantillons.....	72
❖ Lyse de l'éluat des écouvillons.....	72
❖ Lyse des cartes FTA®.....	73
2.3.3. Fixation, purification et élution des acides nucléiques (fait par un automate).....	74
2.3.4. Préparation des réactifs de la PCR.....	75
2.3.5. Programme d'amplification.....	75
3. Résultats.....	76
3.1 Résultats du calibrage des suspensions de Mh et VRS.....	76
<i>Notre objectif était de réaliser des suspensions de Mh et de VRS de concentration connue afin d'obtenir à la PCR des échantillons (ENP et carte FTA®) un Ct aux environs de 30/32. ....</i>	<i>76</i>
3.2 Résultats bruts de l'étude de l'impact du vieillissement sur la qualité et la précision des échantillons en comparant des écouvillons avec des cartes FTA®.....	77
3.3 Étude de la stabilité de l'échantillon dans le temps.....	77
3.3.1. Stabilité des écouvillons avec Mh.....	77
3.3.1.1 Stabilité pour Mh des écouvillons dopés avec la solution pure.....	77
3.3.1.2 Stabilité pour Mh des écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième.....	78
3.3.2. Stabilité des cartes FTA® avec Mh.....	79
3.3.2.1 Stabilité pour Mh des cartes FTA® dopées avec la solution pure.....	79
3.3.2.2 Stabilité pour Mh des cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième.....	80
3.3.3. Stabilité des écouvillons avec le VRS.....	81
3.3.3.1 Stabilité pour VRS des écouvillons dopés avec la solution pure.....	81
3.3.3.2 Stabilité pour le VRS des écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième.....	82
3.3.4. Stabilité des cartes FTA® avec le VRS.....	83
3.3.4.1 Stabilité pour le VRS des cartes FTA® dopées avec la solution pure.....	83
3.3.4.2 Stabilité pour le VRS des cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième.....	84
3.3.5. Conclusion.....	85
3.4 Comparaison entre l'utilisation des écouvillons ou des cartes FTA®.....	85
3.4.1. Échantillons avec Mh.....	85
3.4.1.1. Échantillons avec Mh à J0.....	85

3.4.1.1.1	Échantillons avec Mh à J0 dopés avec la solution pure .....	85
3.4.1.1.2	Échantillons avec Mh à J0 dopés avec la solution diluée au dixième .....	86
3.4.1.2.	<i>Échantillons avec Mh à J7</i> .....	86
3.4.1.2.1	Échantillons avec Mh à J7 dopés avec la solution pure .....	86
3.4.1.2.2	Échantillons avec Mh à J7 dopés avec la solution diluée au dixième .....	87
3.4.1.3.	<i>Échantillons avec Mh à J14</i> .....	87
3.4.1.3.1	Échantillons avec Mh à J14 dopés avec la solution pure .....	87
3.4.1.3.2	Échantillons avec Mh à J14 dopés avec la solution diluée au dixième .....	87
3.4.2.	<i>Échantillons avec le VRS</i> .....	88
3.4.2.1.	<i>Échantillons avec le VRS à J0</i> .....	88
3.4.2.1.1	Échantillons avec VRS à J0 dopés avec la solution pure.....	88
3.4.2.1.2	Échantillons avec VRS à J0 dopés avec la solution diluée au dixième.....	89
3.4.2.2.	<i>Échantillons avec le VRS à J7</i> .....	89
3.4.2.2.1	Échantillons avec le VRS à J7 dopés avec la solution pure.....	89
3.4.2.2.2	Échantillons avec le VRS à J7 dopés avec la solution diluée au dixième .....	90
3.4.2.3.	<i>Échantillons avec le VRS à J14</i> .....	90
3.4.2.3.1	Échantillons avec le VRS à J14 dopés avec la solution pure.....	90
3.4.2.3.2	Échantillons avec le VRS à J14 dopés avec la solution diluée au dixième .....	91
3.4.3.	<i>Conclusion</i> .....	91
3.5.	<i>Reproductibilité des manipulations</i> .....	92
3.5.1.	Reproductibilité des échantillons avec Mh .....	92
3.5.1.1.	Écouillons Mh .....	92
3.5.1.1.1.	Écouillons Mh à J0.....	92
3.5.1.1.2.	Écouillons Mh à J7.....	93
3.5.1.1.3.	Écouillons Mh à J14.....	93
3.5.1.1.4.	Bilan écouillons Mh.....	94
3.5.1.2.	Cartes FTA® Mh .....	94
3.5.1.2.1.	Cartes FTA® Mh à J0 .....	94
3.5.1.2.2.	Cartes FTA® Mh à J7 .....	95
3.5.1.2.3.	Cartes FTA® Mh à J14.....	95
3.5.1.2.4.	Bilan cartes FTA® Mh .....	96
3.5.2.	Reproductibilité des échantillons avec le VRS .....	96
3.5.2.1.	Écouillons VRS.....	96
3.5.2.1.1.	Écouillons VRS à J0 .....	96
3.5.2.1.2.	Écouillons VRS à J7 .....	97
3.5.2.1.3.	Écouillons VRS à J14 .....	97
3.5.2.1.4.	Bilan écouillons VRS.....	98
3.5.2.2.	Cartes FTA® VRS.....	98
3.5.2.2.1.	Cartes FTA® VRS à J0 .....	98
3.5.2.2.2.	Cartes FTA® VRS à J7 .....	99
3.5.2.2.3.	Cartes FTA® VRS à J14 .....	99
3.5.2.2.4.	Bilan cartes FTA® VRS .....	100
3.5.3.	Conclusion reproductibilité .....	100
4.	Discussion .....	100
4.1.	<i>Discussion sur les résultats obtenus</i> .....	101
4.2.	<i>Limites de l'étude</i> .....	103
	<b>Conclusion</b> .....	<b>104</b>
	<b>Liste des références bibliographiques</b> .....	<b>106</b>



# Liste des figures

---

Figure 1 : Représentation schématique du virus de l'IBR.....	23
Figure 2 : Schéma des modes de dissémination du virus de l'IBR .....	24
Figure 3 : Représentation schématique du virus Pi-3.....	28
Figure 4 : Schéma de l'entrée dans la cellule du virus Pi-3 (Dessin personnel, inspiré de ELLIS, 2010).....	29
Figure 5 : Représentation schématique du virus de la BVD.....	31
Figure 6 : Conséquences sur le fœtus lors de l'infection par le virus de la BVD en fonction du stade de gestation (BELBIS G., 2017).....	33
Figure 7 : Représentation schématique du VRS .....	39
Figure 8 : Représentation schématique du BCoV .....	43
Figure 9 : Schéma du cycle évolutif de Dictyocaulus viviparus et ses conséquences cliniques (Dessin personnel, inspiré de GUERIN D., 2011).....	52
Figure 10 : Schéma de la préparation des écouvillons (Dessin personnel).....	69
Figure 11 : Schéma de la préparation des cartes FTA® (Dessin personnel).....	70
Figure 12 : Schéma des étapes de lyse de l'éluat des écouvillons (Dessin personnel).....	71
Figure 13 : Schéma des étapes de lyse des cartes FTA® (Dessin personnel).....	71
Figure 14 : Plan de la plaque de lyse Deep-well.....	72
Figure 15 : Plan d'une plaque PCR .....	73
Figure 16 : Reproductibilité des écouvillons Mh à J0.....	90
Figure 17 : Reproductibilité des écouvillons Mh à J7.....	91
Figure 18 : Reproductibilité des écouvillons Mh à J14.....	92
Figure 19 Reproductibilité des cartes FTA® Mh à J0.....	93
Figure 20 : Reproductibilité des cartes FTA® Mh à J7.....	93
Figure 21 : Reproductibilité des cartes FTA® Mh à J14.....	94
Figure 22 : Reproductibilité des écouvillons VRS à J0.....	95
Figure 23 : Reproductibilité des écouvillons VRS à J7.....	96
Figure 24 : Répétabilité des écouvillons VRS à J14.....	96
Figure 25 : Reproductibilité des cartes FTA® VRS à J0.....	97

Figure 26 : Reproductibilité des cartes FTA® VRS à J7.....	98
Figure 27 : Reproductibilité des cartes FTA® VRS à J14.....	98

# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Bilan sur la Rhinotrachéite Infectieuse Bovine.....	27
Tableau 2 : Bilan sur le Virus Parainfluenza de type 3.....	30
Tableau 3 : Moyens de diagnostic de la BVD (BELBIS G., 2017 ; RAVARY-PLUMIOËN B. et al., 2020).....	36
Tableau 4 : Quelles analyses choisir pour le diagnostic de la BVD ? (BELBIS G., 2017).....	37
Tableau 5 : Bilan sur la Diarrhée Virale Bovine.....	38-39
Tableau 6 : Bilan sur le Virus Respiratoire Syncytial Bovin.....	42
Tableau 7 : Bilan sur le Coronavirus Bovin.....	45
Tableau 8 : Facteurs de virulence des pasteurelles pulmonaires (PANCIERA ET CONFER, 2010).	46
Tableau 9 : Avantages et inconvénients de la culture bactérienne et de la PCR dans le diagnostic des pasteurelloses respiratoires.....	48
Tableau 10 : Bilan sur les Pasteurelloses pulmonaires.....	48
Tableau 11 : Facteurs de virulence des mycoplasmes.....	49
Tableau 12 : Bilan sur les Mycoplasmoses pulmonaires.....	51
Tableau 13 : Bilan sur la Dictyocaulose.....	54
Tableau 14 : Bilan des différents prélèvements de l'appareil respiratoire.....	61
Tableau 15 : Récapitulatif des prélèvements conseillés et des délais pour les réaliser pour les différents agents pathogènes respiratoires chez les bovins.....	62
Tableau 16 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de prélèvement respiratoire chez les bovins (modifié de (PARDON ET BUCZINSKI, 2020)).....	63
Tableau 17 : Résumé des différents échantillons réalisés pour chaque séance et à quels moments ils sont analysés.....	67
Tableau 18 : Détecteurs créés sur le thermocycleur.....	73
Tableau 19 : Programme de RT-PCR.....	74
Tableau 20 : Résultats du calibrage des suspensions de Mh et VRS.....	74
Tableau 21 : Résultats bruts des 3 séances d'analyses.....	75
Tableau 22 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écarts types pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution pure pour Mh.....	75



Tableau 23 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution pure pour Mh entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes .....	76
Tableau 24 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écarts types pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième pour Mh.....	76
Tableau 25 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième pour Mh entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec : les moyennes ne sont pas significativement différentes .....	77
Tableau 26 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écarts types pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution pure pour Mh.....	77
Tableau 27 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution pure pour Mh entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes .....	78
Tableau 28 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écarts types pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième pour Mh.....	78
Tableau 29 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième pour Mh entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes .....	79
Tableau 30 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écarts types avec test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution pure pour le VRS.....	79
Tableau 31 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution pure pour VRS entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes .....	80
Tableau 32 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écarts types avec test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième pour le VRS.....	80
Tableau 33 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième pour VRS entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes .....	81
Tableau 34 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écarts types pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution pure pour le VRS.....	81
Tableau 35 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution pure pour VRS entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des valeurs différentes ...	82
Tableau 36 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écarts types pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième pour le VRS.....	82

Tableau 37 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième pour le VRS entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes .....	83
Tableau 38 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour Mh, à J0 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes .....	83
Tableau 39 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour Mh, à J0 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes.....	84
Tableau 40 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour Mh, à J7 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes.....	84
Tableau 41 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour Mh, à J7 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes.....	85
Tableau 42 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour Mh, à J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes.....	85
Tableau 43 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour Mh, à J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes.....	86
Tableau 44 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour VRS à J0 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes.....	86
Tableau 45 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour le VRS à J0 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes.....	87
Tableau 46 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure pour le VRS à J7 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes.....	87
Tableau 47 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième pour le VRS à J7 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes.....	88
Tableau 48 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour le VRS à J14 avec H0 : les	

moyennes ne sont pas significativement différentes, mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes..... 89

Tableau 49 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour le VRS à J14 avec  $H_0$  : les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes..... 89

Tableau 50 : Rappel des résultats obtenus..... 100

Tableau 51 : Études comparant les écouvillons aux cartes FTA® ..... 101

# Liste des abréviations

---

ATT : Aspiration Trans-Trachéale

BCoV : Coronavirus bovin (Bovine Coronavirus)

BVD : Diarrhée Virale Bovine (Bovine Viral Diarrhea)

CP : Cytopathogène

Ct : Cycle de seuil

ELISA : Technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (Enzyme-Linked Immuno Assay)

ENP : Écouvillonnage Nasal Profond

EPC : Contrôle Positif Externe (External Positive Control)

FAM™ : 6-carboxyfluorescéine

FHA : Hémagglutinine Filamenteuse (Filamentous Hemagglutinin)

FTA® : Flinders Technology Associates ®

HPV : Papillomavirus Humain

Hs : *Histophilus somni*

IBR : Rhinotrachéite Infectieuse Bovine

IgA : Immunoglobuline de type A

IgBPs : Protéines attachées aux immunoglobulines (Immunoglobulin-binding proteins)

IPC : Contrôle Positif Interne (Internal Positive Control)

IPI : Infecté Permanent Immunotolérant

LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire

LOS : Lipoolisaccharide

LKT : Leucotoxine (Leukotoxin)

LPS : Lipopolysaccharide

Mb : *Mycoplasma bovis*

Mh : *Mannheimia haemolytica*

NCP : Non-Cytopathogène

NCS : Témoin négatif

NFQ : Quencher non fluorescent (Non-Fluorescent Quencher)

OmpA : Protéine A de la membrane externe (Outer membrane protein A)

PBS : Tampon phosphate alcalin (Phosphate buffered saline)

PCR : Réaction de Polymérase en Chaîne (Polymerase Chain Reaction)

Pi-3/BPI3 : Virus Parainfluenza de type 3

Pm : *Pasteurella multocida*

RT-PCR : Réaction de Polymérase en Chaîne après transcription inverse (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

VIC™ : Victoria™

VRS/RSV : Virus Respiratoire Syncytial

# Introduction

---

Dans la pratique vétérinaire en milieu rural, les affections de l'appareil respiratoire chez les bovins sont des affections très courantes. Ces affections sont souvent d'origine infectieuse et de nombreux agents pathogènes ont un tropisme respiratoire : des virus, des bactéries, des parasites...

Ainsi, afin de pouvoir mieux choisir ou adapter la stratégie thérapeutique et préventive que l'on va mettre en place dans un élevage, la recherche de ces agents pathogènes est un élément majeur. En effet, la connaissance de l'agent pathogène spécifique mis en cause dans l'affection permet de mieux cibler le traitement et la prévention, ainsi que de limiter par exemple l'usage d'antibiotiques et donc d'être en accord avec les pratiques actuelles d'usage prudent et raisonné des antibiotiques ; de plus, cela prend en compte le respect du bien-être animal car une meilleure approche thérapeutique entraînera une diminution de la souffrance que l'affection peut causer à l'animal.

Cette mise en évidence des agents pathogènes responsables pourra se faire à partir de diverses sortes de prélèvements qui pourront par la suite être acheminés en laboratoire afin de déterminer précisément l'agent pathogène mis en cause dans l'affection. Cependant, les différents prélèvements de l'appareil respiratoire disponibles en médecine vétérinaire nécessitent des conditions de stockage et d'envoi peu compatibles avec la pratique de la médecine vétérinaire en milieu rural : froid positif voire congélation avec notamment des variations thermiques pouvant être intenses dans le véhicule du praticien pouvant altérer le prélèvement, ...

Récemment, des recherches ont été effectuées sur un mode d'acheminement de ces prélèvements qui apparaît comme étant robuste et simple d'utilisation et qui pourrait rendre plus facile le recours à ces examens complémentaires : la carte FTA® (Flinders Technology Associates) : elle permet de conserver un prélèvement à température ambiante, ce qui permettrait de pallier les contraintes du vétérinaire rural itinérant.

Dans cette optique, nous allons nous demander quels sont les agents pathogènes responsables de maladies respiratoires chez les bovins et quels sont les différents types de prélèvements réalisables afin de déterminer l'agent pathogène responsable et quel est leur mode d'acheminement en laboratoire. Nous allons également nous demander si les cartes FTA® sont des moyens d'acheminement fiables et robustes de ces différents prélèvements.

Nous allons pour cela détailler dans une première partie tous les agents pathogènes responsables de maladies respiratoires chez les bovins et les particularités liées à l'espèce qui font que ce sont des animaux fort sujets aux affections respiratoires. Nous développerons aussi les types de prélèvements liés aux affections respiratoires, de leur réalisation à l'acheminement au laboratoire et quel type de prélèvement préférer lors des différentes circonstances auxquelles on peut être confronté.

Puis dans une seconde partie, nous comparerons dans une étude la stabilité et les différences potentiellement observables entre l'Écouvillon Nasal Profond (ENP) et la carte FTA® afin de déterminer si la carte FTA® est une méthode de stockage et d'envoi de prélèvement respiratoire utilisable.



# Première partie : Bibliographie :

## Pathologie respiratoire chez les bovins : physiopathologie, prélèvements et mise en pratique en milieu rural

---

Les maladies respiratoires constituent une des grandes dominantes pathologiques de l'espèce bovine. Après un rappel des particularités anatomiques de l'appareil respiratoire des bovins, nous étudierons les différents agents pathogènes respiratoires viraux, puis bactériens et enfin un parasite responsable d'affections respiratoires chez les bovins.

### 1. Pathologie respiratoire chez les bovins : principaux agents pathogènes responsables et physiopathologie associée

#### 1.1 Particularités anatomiques de l'appareil respiratoire des bovins et prédispositions aux maladies respiratoires

**Les bovins sont prédisposés aux maladies respiratoires** rien que du fait de leurs particularités anatomiques (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020) :

- Le rapport entre le volume pulmonaire et la masse musculaire des bovins est faible ce qui les **prédispose à l'insuffisance respiratoire** sans même l'action d'un agent pathogène ;
- Les voies respiratoires supérieures présentent un diamètre en proportion plus faible que chez les autres espèces et leurs surfaces alvéolaires sont plus faibles et moins vascularisées ce qui entraîne une **fréquence respiratoire plus élevée en proportion du poids de ces animaux, ce qui favorise la pénétration des agents pathogènes dans les voies respiratoires** ;
- L'arbre respiratoire est en proportion plus long que chez les autres espèces, ce qui augmente le volume d'espace mort, a un impact sur la quantité d'oxygène délivré aux alvéoles à chaque mouvement respiratoire et favorise **l'augmentation du temps de transit de l'air dans les voies respiratoires et donc la probabilité d'installation des agents pathogènes inhalés** ;
- Les poumons des bovins présentent une compartimentation importante avec des voies respiratoires peu ramifiées, ce qui **diminue les possibilités de shunt lors d'atteinte d'une partie du parenchyme pulmonaire** ;
- L'escalator muco-ciliaire et l'immunité locale sont moins développés par rapport à d'autres espèces, ce qui **ne favorise pas l'élimination des germes**.

Pour toutes ces raisons, les maladies respiratoires chez les bovins sont des maladies très fréquentes et peuvent atteindre les jeunes animaux comme les plus vieux.



## 1.2 Principaux agents pathogènes responsables des maladies respiratoires chez les bovins et physiopathogénie associée

Les maladies respiratoires chez les bovins sont généralement des **maladies multifactorielles** comprenant différents agents pathogènes et des facteurs environnementaux (GRISSET *et al.*, 2015).

Concernant les agents pathogènes, ils peuvent être d'origine bactérienne, virale ou parasitaire :

Parmi les **agents pathogènes viraux**, on retrouvera principalement l'**Herpesvirus Bovin de type 1** responsable de la Rhinotrachéite Infectieuse Bovine (IBR), le **Parainfluenza virus de type 3** (Pi-3), le **virus de la Diarrhée Virale Bovine** (BVD), le **Virus Respiratoire Syncytial Bovin** (VRS) et le **Coronavirus bovin** (BCoV) (GRISSETT *et al.*, 2015) (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

Parmi les **agents pathogènes bactériens**, on retrouvera principalement ***Mannheimia haemolytica* (Mh)**, ***Mycoplasma bovis***, ***Pasteurella multocida*** et ***Histophilus somni*** (GRISSETT *et al.*, 2015).

Enfin, parmi les **agents pathogènes parasitaires**, on retrouvera principalement la dictyocaulose due à ***Dictyocaulus viviparus*** (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

### 1.2.1 Agents pathogènes respiratoires viraux

#### 1.2.1.1 Rhinotrachéite Infectieuse Bovine (IBR)

##### 1.2.1.1.1 Caractéristiques du virus

La Rhinotrachéite Infectieuse Bovine est une maladie respiratoire des bovins due à un virus appartenant à la famille des **Herpesvirus** : l'**Herpesvirus de type 1**, aussi appelé **BoHV-1**. Il s'agit d'un virus à ADN double brin ayant la capacité d'induire des **infections persistantes avec phase de latence**.

Le matériel génétique du virus est protégé, de l'intérieur vers l'extérieur par une **capside symétrique icosaédrique** (polyèdre comportant 20 faces), un **tégument** doublant l'enveloppe puis par une enveloppe constituée de nombreuses **glycoprotéines** (Muylkens *et al.*, 2007) comme illustré ci-dessous sur la figure 1. En effet, 10 glycoprotéines sont décrites (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL et gM). Certaines possèdent des propriétés antigéniques marquées (notamment gD) et d'autres sont dites non essentielles : elles ne sont pas essentielles à la multiplication virale (gE par exemple) (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

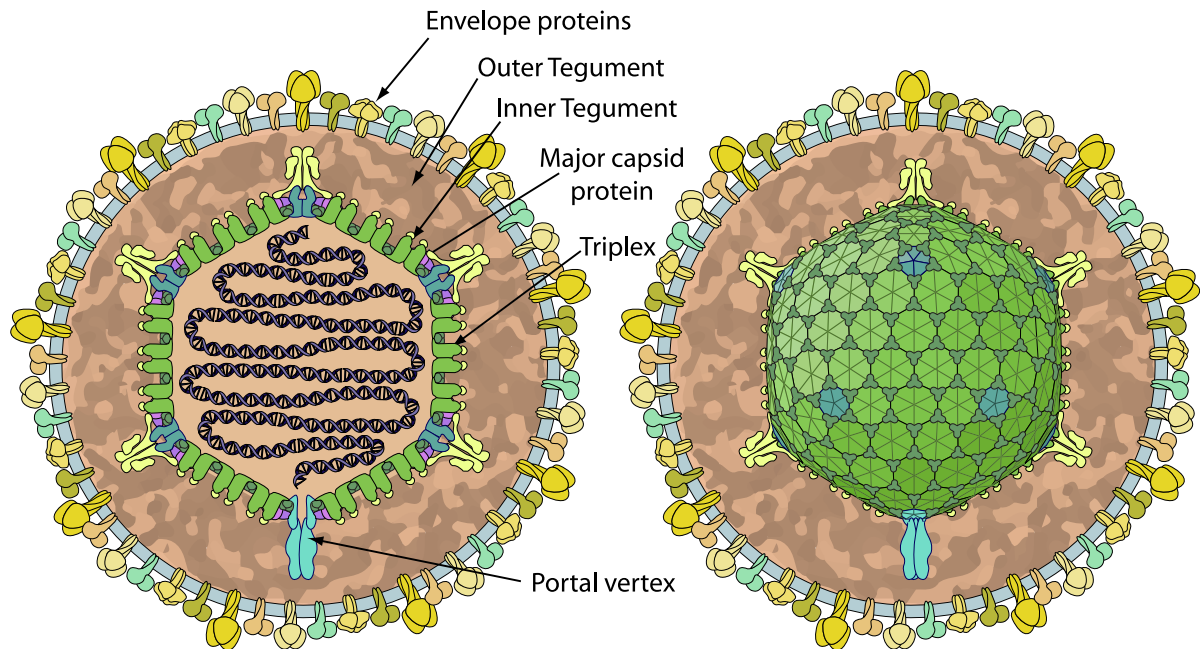


Figure 1 : Représentation schématique du virus de l'IBR ((VIRALZONE, 2023a))

#### 1.2.1.1.2 Physiopathologie

##### ❖ Entrée dans la cellule et réplication

Le virus va entrer dans l'organisme par le biais de **contacts étroits** (« mufler à mufler ») entre un bovin sain et un bovin infecté, par la **semence** si le taureau utilisé est en phase de primo-infection ou durant la phase de réactivation avec ré-excrétion ou via le **jetage** (RAVARY-PLUMIOËN B. et al., 2020) (FRGDS OCCITANIE, 2021).

Le virus entre dans la cellule cible grâce à la **complémentarité** entre les récepteurs présents à la surface de la cellule cible et les glycoprotéines de l'enveloppe du virus. Puis, le virus est transporté le long des microtubules jusqu'au noyau afin qu'il puisse se répliquer avec les protéines de la cellule hôte. Les produits de la réplication sont alors enveloppés par le biais de la membrane nucléaire puis ils sont transportés dans des vésicules intracellulaires à la membrane cytoplasmique et expulsés de la cellule. La réplication du virus commence 2 heures après l'infection et l'expression des antigènes de surface est détectée 3-4 heures après l'infection, l'excrétion virale commence 8 heures après l'infection (OFFICE OF THE GENE TECHNOLOGY REGULATOR, DEPARTMENT OF HEALTH, AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2021).

Ces cellules cibles possédant les récepteurs compatibles avec les glycoprotéines de l'enveloppe du virus sont les **cellules épithéliales du haut appareil respiratoire, membranes muqueuses des cellules vaginales et du prépuce** et les cellules des **amygdales** et des **conjonctives** comme les **lymphocytes T CD4+**, les **monocytes** et les **macrophages** (OFFICE OF THE GENE TECHNOLOGY REGULATOR, DEPARTMENT OF HEALTH, AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2021).

### ❖ Modes de disséminations du virus

Lors d'une infection, le virus se multiplie d'abord au site d'entrée du virus donc dans les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur ou de la muqueuse génitale. Puis, le virus peut se disséminer par **3 voies** : sanguine, nerveuse et de cellule en cellule (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020), qui sont illustrées sur la figure 2 ci-dessous.

Lors d'une **dissémination par voie sanguine**, le virus peut atteindre différents organes cibles comme le tractus digestif, les ovaires, le fœtus... (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

Lors d'une **dissémination nerveuse**, le virus infecte les nerfs périphériques proches du site d'infection. Il remonte par voie axonale les neurones jusqu'au ganglion nerveux régional. Ici, le virus va s'installer à l'état latent : il ne se multiplie plus mais n'est pas éliminé par l'organisme. En général, le virus persiste dans le ganglion trijumeau lorsqu'il est introduit par voie respiratoire et dans le ganglion sacré lorsqu'il est introduit par voie génitale (OFFICE OF THE GENE TECHNOLOGY REGULATOR, DEPARTMENT OF HEALTH, AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2021). Un virus ainsi installé à l'**état latent** peut se **réactiver** et conduire à une ré-excrétion avec peu ou pas de signes cliniques associés suite à un stimulus comme un stress, un transport, une injection de glucocorticoïdes, une infection par un autre virus, ... (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

La **transmission de cellule en cellule** est importante lors de réactivation d'un virus latent chez un animal immunisé : ce mode de transmission lui permet d'être à l'abri des anticorps spécifiques développés par l'individu (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

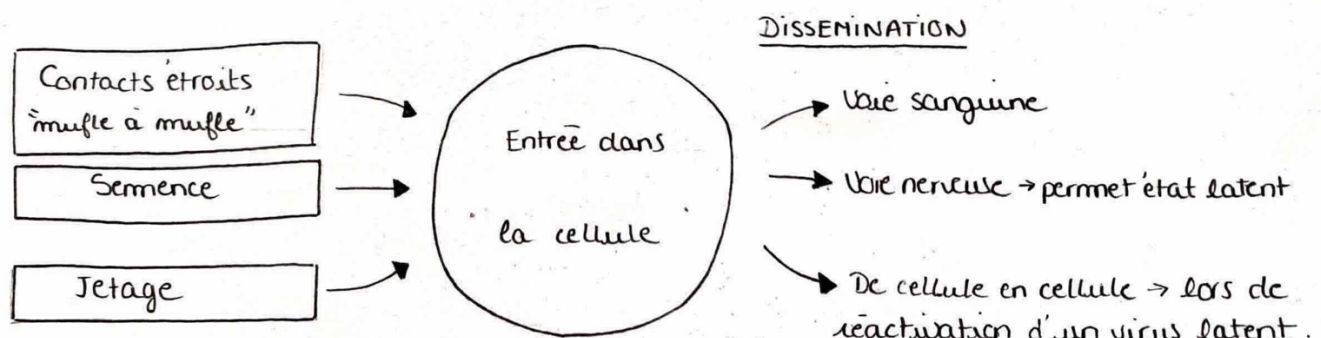


Figure 2 : Schéma des modes de dissémination du virus de l'IBR (Dessin personnel, inspiré de RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020)

### ❖ Excrétion du virus

Le virus se multiplie alors intensément dans les cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire lors d'infection par voie respiratoire. Il y est alors excrété en grande quantité dans le **mucus nasal** jusqu'à **10 à 16 jours après infection** avec un **pic d'excrétion à 5 jours**. Suite à cette infection, la **réponse cellulaire** spécifique apparaît **dès 5 jours après infection avec un pic à partir de 7-10 jours** coïncidant avec la diminution de l'excrétion virale et la guérison. Les **anticorps apparaissent après 10 jours** (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020). Tout ceci est illustré sur la figure 3 ci-dessous.

### 1.2.1.1.3 Épidémiologie

En France, la **prévalence moyenne nationale** de l'infection de **9%** mais la situation épidémiologique n'est pas homogène : on observe un taux de prévalence sensiblement plus bas dans les régions à vocation laitière (MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION, 2010).

**Au sein d'un troupeau, les sources de virus** sont (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020) :

- Les **animaux infectés**, c'est-à-dire malades et excréteurs d'une quantité élevée de virus pendant 1 à 2 semaines maximum :
- Les **animaux ré-excréteurs** (durée d'excrétion de quelques jours et quantité de virus excrétée plus faible que chez les malades ; ceci conduit alors à un nombre limité d'animaux infectés) :
- Les **animaux réservoirs** (rare).

Les **sécrétions les plus contagieuses** sont les sécrétions **respiratoires, oculaires et génitales**. Une transmission indirecte est également possible via le matériel souillé ou le personnel (FRGDS OCCITANIE, 2021).

La **contamination entre les élevages** se fait par le biais de l'achat de bovins sources de virus ou lors de rassemblement d'animaux (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

### 1.2.1.1.4 Signes cliniques

Une infection par l'Herpesvirus bovin de type 1 peut présenter différentes formes cliniques (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020):

- Une **forme subclinique** qui est la forme la plus fréquente. En effet, les épisodes cliniques recensés aujourd'hui sont rares ; la maladie possède essentiellement des répercussions commerciales (FRGDS OCCITANIE, 2021).
- Une **forme respiratoire** : on observe alors :
  - Une **hyperthermie systémique** sévère allant jusqu'à 42°C ;
  - Une **hyperthermie marquée de la muqueuse nasale** associée à des ulcérations (le nez apparaît alors « rouge ») ;
  - Une **toux** ;
  - Un **jetage nasal** très prononcé, séreux initialement puis rapidement muco-purulent qualifié de « jetage en chandelles ».
- Une **forme oculaire**, qui peut être concomitante de la forme respiratoire. On observe alors sur un œil ou sur les deux yeux :
  - Un **écoulement oculaire séreux** ;
  - Une **conjonctivite** ;
  - Un **œdème cornéen**, la cornée apparaissant bleutée.

- Une **forme génitale** : on observe alors :
  - Chez le mâle une **balanoposthite** ;
  - Chez la femelle une **vulvo-vaginite**.
- Une **forme abortive** : une épidémie d'IBR peut conduire à des avortements entre le 4<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> mois de gestation. De plus, l'infection par le virus peut occasionnellement provoquer des lésions ovariennes autour de l'œstrus ayant pour conséquences de la mortalité embryonnaire précoce et des retours en chaleur. Cependant, cette forme n'est pas possible lors de réactivation virale, elle l'est uniquement lors d'une primo-infection (GDS DE BOURGOGNE - FRANCHE-COMTÉ, 2021).

La forme la plus fréquente est la forme subclinique. Malgré le fait qu'elle n'induit alors pas de signes cliniques, elle peut faciliter le développement d'infections respiratoires secondaires (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

#### 1.2.1.1.5 Diagnostic

Étant donné que l'IBR est une **maladie réglementée** depuis 2006, un dépistage est obligatoire dans tout élevage français. Il consiste en (MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION, 2010) :

- Un **dépistage sérologique à l'introduction** pour l'ensemble des bovins, quel que soit leur âge ;
- Un dépistage sérologique des cheptels, **semestriel sur lait de tank** dans les élevages laitiers et **annuel sur prélèvement sanguin des bovins de plus de 24 mois** dans les élevages allaitants ;
- Une **vaccination** des bovins ayant un résultat sérologique positif qui doit être réalisée dans les 2 mois suivant la notification du résultat à l'éleveur, ou alors ils doivent être réformés.

Lors de la recherche du virus lors de présence de signes cliniques respiratoires compatibles avec une infection par le virus de l'IBR, celui-ci peut être détecté (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020) :

- De **manière directe** : lors de la présence de signes cliniques, puisque nous avons vu au 1.2.1.1.2 que le virus se multiplie dans les cellules épithéliales du haut appareil respiratoire, un **écouvillonnage nasal profond** peut être réalisé puis analysé par **isolement viral** ou **PCR** (Polymerase Chain Reaction).
- De **manière indirecte** : lorsque l'animal présente des signes cliniques respiratoires et que l'on veut savoir si le virus de l'IBR est impliqué, on cherchera à mettre en évidence une **augmentation significative d'anticorps** grâce à 2 **prises de sang** réalisées à 2-3 semaines d'intervalle, la 1<sup>ère</sup> étant réalisée lorsque l'animal est malade.

### 1.2.1.1.6 Bilan

Le bilan au sujet de l'IBR est rassemblé dans le tableau 1 ci-dessous.

#### RHINOTRACHÉITE INFECTIEUSE BOVINE (IBR)

<p><b>Caractéristiques du virus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Herpesvirus à ADN double brin</li> <li>• Infections persistantes avec phase de latence et réactivation (stress)</li> </ul>	<p><b>Physiopathologie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Entrée dans organisme</u> : contact étroit, semence, jetage</li> <li>• <u>Cellules cibles</u> : cellules épithéliales haut appareil respiratoire, membranes muqueuses cellules vaginales et prépuce et cellules des amygdales et des conjonctives</li> <li>• <u>Dissémination</u> : voie sanguine, nerveuse, de cellule en cellule</li> <li>• <u>Excrétion</u> :             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mucus nasal : jusqu'à 10-16j post-infection (pic à 5j)</li> <li>- Réponse cellulaire : dès 5j post-infection (pic à 7-10j) → diminution excrétion virale et guérison</li> <li>- Anticorps : après 10j</li> </ul> </li> </ul>	<p><b>Épidémiologie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Animaux infectés, ré-excréteurs ou réservoirs</li> <li>• Sécrétions les plus contagieuses : sécrétions respiratoires, oculaires et génitales + matériel souillé et personnel</li> </ul>
<p><b>Signes cliniques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Forme subclinique</li> <li>• Forme respiratoire (fièvre, ulcérations nasales, toux, jetage)</li> <li>• Forme oculaire</li> <li>• Forme abortive</li> </ul>		<p><b>Diagnostic</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Direct : ENP (isolement viral ou PCR)</li> <li>• Indirect : sérologie</li> </ul>

Tableau 1 : Bilan sur la Rhinotrachéite Infectieuse Bovine

### 1.2.1.2 Virus Parainfluenza de type 3 (PI-3)

#### 1.2.1.2.1. Caractéristiques du virus

Le virus Pi-3 appartient à la famille des **Paramyxoviridae**, genre **Respirovirus** (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020). Les Paramyxoviridae sont des **virus enveloppés à ARN non segmenté**. Leur enveloppe contient une **protéine HN** regroupant les fonctions des protéines **Hémagglutinine (H)** et **Neuraminidase (N)** ainsi qu'une **protéine de fusion (F)**, comme illustré par la figure 3 ci-dessous.

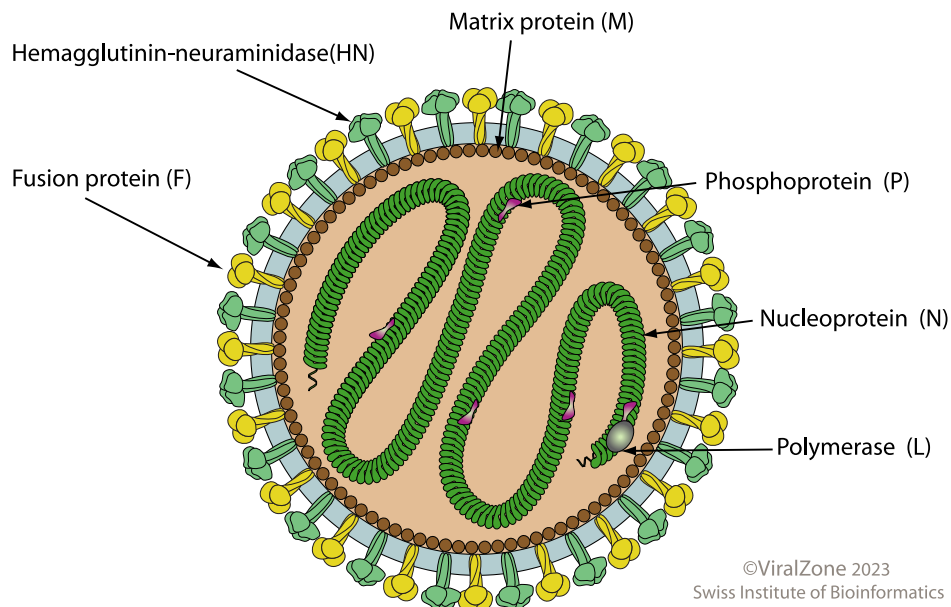


Figure 3 : Représentation schématique du virus Pi-3 (VIRALZONE, 2023b)

#### 1.2.1.2.2. Physiopathologie

##### ❖ Modes de dissémination du virus, entrée dans la cellule et réplication

Le virus Pi-3 est diffusé principalement par les **gouttelettes** (jetage) qui sont inhalées dans l'appareil respiratoire. Le virus va entrer en contact avec la muqueuse contenant une grande quantité d'**acide salicylique** qui est le substrat naturel de l'activité neuraminidase de la glycoprotéine HN. Ainsi, la **protéine HN va se lier à l'acide salicylique**, ce qui permet la liaison du virus aux glycoprotéines et glycolipides de l'hôte. Tout cela est favorisé par l'action concomitante de **l'activité hémagglutinine** de la protéine HN (ELLIS, 2010) (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

L'omniprésence de récepteurs à acide salicylique sur certaines cellules de l'appareil respiratoire explique **l'infection ciblée du virus Pi-3** : le virus se multiplie au niveau de la muqueuse respiratoire puis il se dissémine localement dans le tractus respiratoire. Ce sont dans les **cellules épithéliales de l'ensemble du tractus respiratoire et les macrophages alvéolaires** que le virus se développe : les cellules de la **trachée**, les cellules ciliées des **bronches**, les cellules ciliées et non ciliées des **bronchioles** ainsi que les **pneumocytes de type I et II**. Une infection des cellules de la cavité nasale et du pharynx sont également probables mais moins bien documentées (ELLIS, 2010) (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

Une fois la particule virale attachée à la cellule, la protéine HN interagit avec la protéine F, ce qui va engendrer un changement de conformation de celle-ci et provoquer une **fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte**. Une fois que la fusion a eu lieu, il y a un remaniement des protéines de la cellule hôte qui permet à la nucléocapside virale d'entrer dans le cytoplasme (ELLIS, 2010) comme illustré dans la figure 4 ci-dessous.



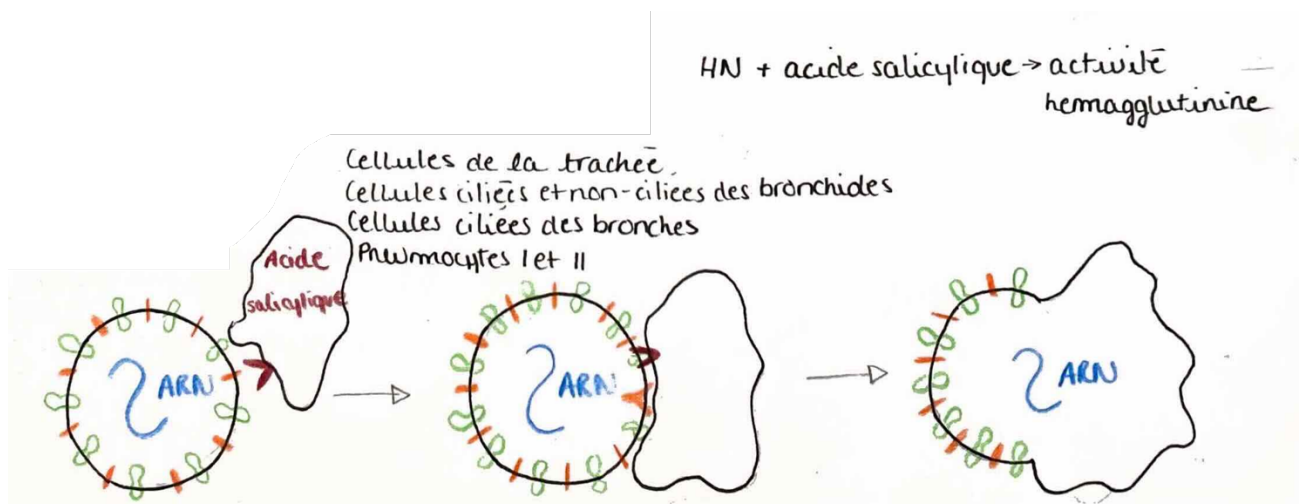


Figure 4 : Schéma de l'entrée dans la cellule du virus Pi-3 (Dessin personnel, inspiré de ELLIS, 2010)

Suite à quelques changements de la nucléocapside non encore élucidés, la réplication virale commence dans le cytoplasme et est associée à la présence de **corps d'inclusions intracytoplasmiques** (ELLIS, 2010).

#### ❖ Excrétion du virus

Une fois que l'infection a eu lieu, **le virus se multiplie au niveau de la muqueuse respiratoire et il se dissémine localement dans le tractus respiratoire** (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020). Le virus est alors transmis via inhalation dans l'appareil respiratoire de mucus nasal, de sécrétions oculaires et de gouttelettes (ELLIS, 2010).

#### 1.2.1.2.3.Épidémiologie

En climat tempéré, la maladie est présente **en automne et en hiver** et est **souvent associée à d'autres maladies respiratoires** (ELLIS, 2010).

La transmission se faisant via les excréments respiratoires des bovins infectés, elle est plus importante lors de **concentration élevée de bovins** (marchés, transport, dans les étables à veaux, ...) (ELLIS, 2010).

La dose infectante n'est pas connue mais est probablement bien moins importante que la concentration de virus présente dans les excréments respiratoires. Le virus reste infectant durant 3 heures dans les gouttelettes nasales et sa viabilité est améliorée par les températures froides (6°C). Sa durée d'infectiosité dans les conditions environnementales n'est pas connue (ELLIS, 2010).

#### 1.2.1.2.4.Signes cliniques

S'il n'y a pas de surinfection bactérienne en plus de l'infection virale, les signes cliniques sont souvent **absents**. Lorsqu'ils sont présents, on observe les **signes classiques associés aux pneumonies** : fièvre, abattement, jetage nasal séreux, larmolement, dyspnée et toux, mais ces signes sont difficilement attribuables au virus Pi-3 seul (ELLIS, 2010 ; RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).



### 1.2.1.2.5. Diagnostic

Lorsqu'on suspecte la présence du virus Pi-3 dans l'affection respiratoire, plusieurs modalités diagnostiques sont possibles (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020) :

- **Identification directe** sur **ENP** ou **liquide d'Aspiration Trans-Trachéale (ATT)** par **RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)** ;
- **Identification indirecte** par **sérologie** (ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay)) sur prises de sang couplées.

La limite majeure au diagnostic du virus parainfluenza bovin de type 3 est le **décal entre l'infection et le prélèvement**. En effet, le virus peut être isolé **dans le nez jusqu'à 9 jours post-infection, dans les poumons jusqu'à 12 jours post-infection**. Les méthodes de prélèvement et d'envoi des prélèvements peuvent également faire varier ces délais. De plus, lors de prélèvements post-mortem d'animaux ayant été traités, le virus peut avoir disparu, ce qui peut causer de **nombreux faux-négatifs** (ELLIS, 2010).

### 1.2.1.2.6. Bilan

Le bilan au sujet du virus Parainfluenza de type 3 est rassemblé dans le tableau 2 ci-dessous.

#### PARAINFLUENZA VIRUS DE TYPE 3 (Pi-3)

Caractéristiques du virus	Physiopathologie	Épidémiologie
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Paramyxoviridae</i> du genre <i>Respirovirus</i> enveloppé à ARN non segmenté</li> <li>• Protéines HN et F</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Entrée dans l'organisme</u> : gouttelettes</li> <li>• <u>Cellules cibles</u> : cellules épithéliales de l'ensemble du tractus respiratoire et les macrophages alvéolaires</li> <li>• <u>Dissémination</u> : localement</li> <li>• <u>Excrétion</u> : mucus nasal, sécrétions oculaires, gouttelettes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Automne/Hiver</li> <li>• Concentration élevée de bovins</li> </ul>
<b>Signes cliniques</b>		<b>Diagnostic</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asymptomatique</li> <li>• Pneumonie : fièvre, abattement, jetage nasal séreux, larmoiement, dyspnée, toux</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Direct : ENP ou ATT (RT-PCR)</li> <li>• Indirect : sérologie</li> </ul>

Tableau 2 : Bilan sur le Virus Parainfluenza de type 3

### 1.2.1.3 Diarrhée Virale Bovine (BVD)

#### 1.2.1.3.1. Caractéristiques du virus

Le virus de la BVD est un **virus enveloppé à ARN simple brin positif** appartenant à la famille des **Flaviviridae** et au genre **Pestivirus**.

Il possède différentes protéines comme des **protéines structurales**, notamment la **protéine E0** qui est utilisée en diagnostic par **antigénémie** et la **protéine E2** contre laquelle sont produits les **anticorps neutralisants** et qui est responsable de la variabilité génétique du virus.

Il possède également des **protéines non structurales** qui sont exprimées lors du cycle viral : la **protéine NS2/3 ou NS3** qui induit des **anticorps non protecteurs**. Ce sont ces derniers qui permettent de réaliser une **sérologie ELISA** à partir de 10-15 jours post-infection. Ils sont également transmis par voie colostrale et détectables pendant 6 à 8 mois (BELBIS G., 2017 ; RAVARY-PLUMIOEN B. *et al.*, 2020).

Les caractéristiques du virus de la BVD sont illustrées dans la figure 5 ci-après.

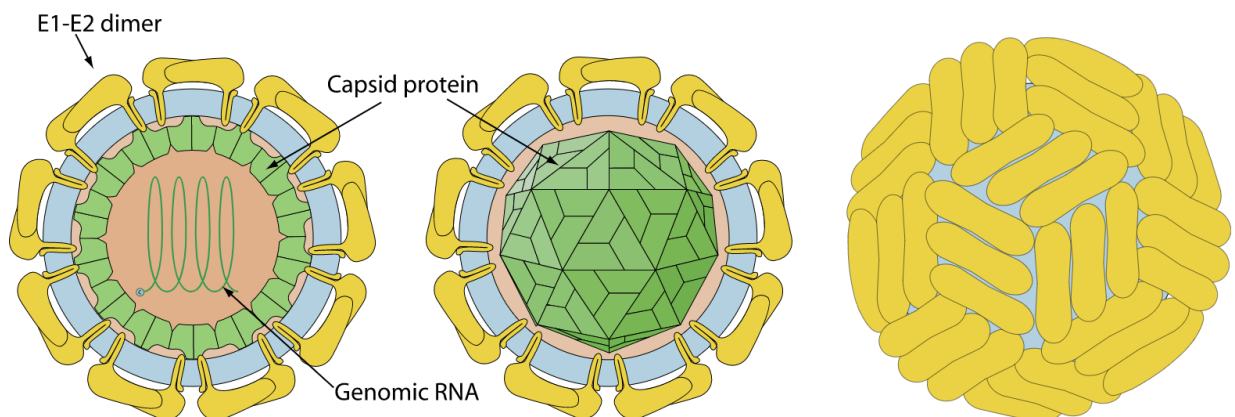


Figure 5 : Représentation schématique du virus de la BVD (VIRALZONE, 2023c)

Ce virus possède **deux biotypes** (BELBIS G., 2017 ; RAVARY-PLUMIOEN B. *et al.*, 2020) :

- **Le biotype cytopathogène (CP)** causant une mortalité et une lyse des cellules lors de culture cellulaire in vitro. Il est éliminé plus rapidement par l'organisme que l'autre biotype et il infecte les **tissus muqueux** ;
- **Le biotype non-cytopathogène (NCP)** qui n'induit pas d'effet cytopathogène. C'est le biotype le plus fréquent, il provoque une production d'anticorps plus forte et plus rapide que le biotype CP et une immunité cellulaire plus importante. Il présente une affinité forte pour les **tissus lymphoïdes**. C'est le seul biotype qui peut conduire à la formation d'un Infecté Permanent Immunotolérant (IPI).

Il possède également **deux génotypes** (BELBIS G., 2017 ; RAVARY-PLUMIOEN B. *et al.*, 2020) :

- **Le génotype I** qui est le plus fréquent en France et est constitué de 12 sous-types ;
- **Le génotype II** qui est très fréquent en Amérique du Nord et en voie d'expansion en Europe et est constitué de 3 sous-types.

La distance phylogénétique entre les différents génotypes est importante, ainsi la protection humorale croisée entre 2 génotypes peut être seulement partielle.

#### 1.2.1.3.2. Physiopathologie

Lors d'une infection par le virus de la BVD, il faut distinguer 2 types d'animaux : les **infectés transitoires** et les **Infectés Permanents Immunotolérants (IPI)**.

##### ✂ **Infection transitoire**

##### ❖ **Entrée dans la cellule et réplication**

Le virus va pénétrer dans l'individu au niveau d'une **muqueuse** ; il a pour cible privilégiée les **cellules épithéliales et les cellules mononucléées sanguines**. Il pénètre par **voie respiratoire** le plus souvent au niveau de la muqueuse oro-nasale par contact muflé à muflé, par **voie conjonctivale** ou par **voie génitale** (transmission par voie sexuelle ou insémination) (BELBIS G., 2017 ; RAVARY-PLUMIOEN B. *et al.*, 2020).

##### ❖ **Modes de dissémination du virus**

Lorsque le virus pénètre par voie respiratoire, il **se multiplie localement** puis il atteint les **voies lymphatiques de drainage** (amygdales, tonsilles) à partir desquelles il est disséminé dans tout le corps.

Quel que soit le mode de pénétration dans l'organisme, 2 à 4 jours plus tard, une **virémie sous forme libre et associée aux cellules mononucléées sanguines** contribue à la dissémination du virus dans l'organisme. C'est alors qu'il atteint la muqueuse intestinale, l'utérus, etc. (BELBIS G., 2017 ; RAVARY-PLUMIOEN B. *et al.*, 2020).

##### ❖ **Excrétion du virus**

Le virus est principalement excrété **par voie verticale via les sécrétions nasales et respiratoires** et également **par voie horizontale directement au fœtus** si le bovin est gestant au moment de l'infection pouvant alors causer (LABORATOIRE DÉPARTEMENTAL D'ANALYSES DE LA LOZÈRE, 2018 ; RAVARY-PLUMIOEN B. *et al.*, 2020) :

- Lorsque l'infection a lieu lors du **1<sup>er</sup> mois de gestation** : une **mortalité embryonnaire** est possible.
- Lorsque l'infection a lieu **entre 80 et 180 jours de gestation**, le virus va infecter les cellules en cours de développement et possiblement engendrer des **malformations congénitales** (porencéphalie, hydranencéphalie, hydrocéphalie, hypoplasie cérébelleuse, agénésie cérébelleuse).
- Lorsque l'infection a lieu **entre 35 et 180 jours de gestation**, le virus peut engendrer la **mort du fœtus et donc un avortement** entre 10 et 60 jours après l'infection du fœtus.

- Lorsque l'infection a lieu **entre 30 et 125 jours de gestation**, le virus va possiblement engendrer la **formation d'un IPI**. (BELBIS G., 2017)

La figure 6 ci-dessous résume les conséquences possibles d'une infection par le virus de la BVD en fonction du moment de la gestation.

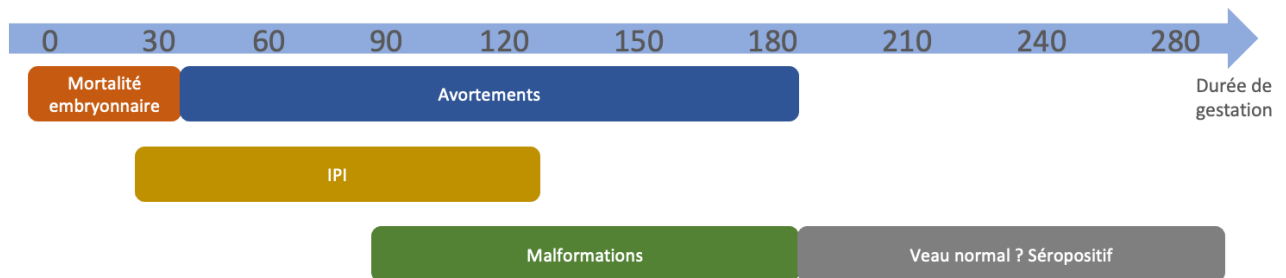


Figure 6 : Conséquences sur le fœtus lors de l'infection par le virus de la BVD en fonction du stade de gestation (BELBIS G., 2017)

### ✂ Infectés Permanents Immunotolérants

#### ❖ Entrée dans la cellule et réplication

Un IPI correspond à un individu ayant **été infecté *in utero* entre le 30<sup>ème</sup> et le 125<sup>ème</sup> jour de gestation par une souche non cytopathogène du virus BVD**. Ainsi, l'infection a lieu lorsque le système immunitaire du fœtus, encore immature, acquiert les éléments de reconnaissance du soi : **l'IPI ne développe donc jamais de réponse immunitaire** vis-à-vis de la souche de virus BVD qu'il héberge (BELBIS G., 2017 ; RAVARY-PLUMIOEN B. *et al.*, 2020).

Ces animaux présentent généralement un retard de croissance, un mauvais état général, un affaiblissement pouvant conduire à la mort par une infection intercurrente et meurent généralement avant l'âge de 2 ans (BELBIS G., 2017).

#### ❖ Excrétion du virus

Les individus IPI représentent une **charge virale majeure et peuvent excréter le virus tout au long de leur vie** (BELBIS G., 2017).

### 1.2.1.3.3. Épidémiologie

Le virus de la BVD est distribué dans le **monde entier**. En France, il est présent partout mais présente une répartition hétérogène. La **prévalence d'IPI** dans la population bovine est voisine de **1%** et **15 à 30%** des troupeaux comporteraient **au moins un IPI**. La **prévalence des animaux séropositifs** varie **entre 36 et 88%** en fonction des régions (RAVARY-PLUMIOEN B. *et al.*, 2020).

Les **sources de virus** sont (BELBIS G., 2017 ; RAVARY-PLUMIOEN B. *et al.*, 2020) :

- **Les espèces hôtes** : IPI (excrètent le virus en grande quantité toute leur vie), **infectés transitoires** (excrètent le virus en moins grande quantité et durant une plus courte période) ;
- **L'environnement** (source modérée étant donné que le virus est peu résistant dans l'environnement) ;

- **Les matières virulentes** : sang, fèces, urines, jetage, salive, placenta, embryons, lait et colostrum.

**Les pertes sont multiples pour l'élevage** : troubles de la reproduction, baisse de production laitière, taux de réforme et mortalité, frais vétérinaires. Le coût est évalué à 46 à 83€/bovin et à 88 millions d'€/an au niveau national (BELBIS G., 2017).

#### 1.2.1.3.4. Signes cliniques

Lors d'une **infection transitoire**, la **forme subclinique** est la plus fréquente mais d'autres formes cliniques sont possibles (BELBIS G., 2017 ; RAVARY-PLUMIOEN B. *et al.*, 2020) :

- **Forme entérique** : **fièvre, abattement, anorexie, diarrhée, toux et jetage nasal, stomatite ulcéreuse**. Peut prendre une allure épizootique chez les animaux de 6 à 18 mois. Chez les animaux de moins de 6 mois, on peut observer des diarrhées néonatales, mais elles sont rares si l'immunité colostrale est efficace.
- **Forme hémorragique** : on observe alors une **hyperthermie marquée**, des **saignements multiples** (fèces hémorragiques, hématurie, ecchymoses et pétéchies sur les muqueuses). Une destruction des plaquettes circulantes peut être mise en évidence. L'issue est généralement fatale.
- **Forme reproductive** : au niveau individuel, la **fertilité des femelles diminue fortement** du fait d'une modification des profils hormonaux et d'une diminution de la qualité des ovocytes. Chez les taureaux, on observe une **infertilité transitoire** par diminution du nombre de spermatozoïdes et une augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux, en conséquence de la fièvre. Les IPI peuvent être normalement fertiles, peu fertiles ou stériles mais de manière permanente. Au niveau du troupeau, le **retour en chaleurs est irrégulier** en raison de la mortalité embryonnaire tardive

Lors d'atteinte chez une **femelle gestante**, différentes formes peuvent être visualisables sur **l'avorton ou le veau nouveau-né** :

- **Une atteinte du système nerveux central** : hypoplasie cérébelleuse, hydranencéphalie ce qui se traduit chez le nouveau-né par une amaurose, une ataxie, une incoordination locomotrice, du nystagmus et des tremblements plus ou moins marqués.
- **Une atteinte oculaire** : microphthalmie ou cataracte congénitale.

Chez les **IPI**, on peut observer plusieurs formes cliniques (BELBIS G., 2017 ; RAVARY-PLUMIOEN B. *et al.*, 2020) :

- **Retard de croissance et sensibilité augmentée aux infections digestives et respiratoires**. Généralement, les IPI meurent avant l'âge de 2 ans.
- Il est possible qu'un IPI présente un **développement normal et ait une durée de vie normale**.

- Développement d'une **maladie des muqueuses** :
  - **Aiguë** si co-infection par une souche CP et une souche NCP identiques d'un point de vue antigénique : évolue sur quelques jours et jusqu'à 2 semaines et s'exprime par des lésions au niveau des muqueuses. Il y a généralement une détérioration rapide de l'état général. L'évolution vers la mort est presque de 100%.
  - **Chronique** si les souches CP et NCP diffèrent légèrement d'un point de vue antigénique : s'exprime sur plusieurs semaines à plusieurs mois sous forme de symptômes identiques à la forme aiguë mais beaucoup plus discrets. On constate une amélioration de l'état général sans traitement puis une rechute. Cette forme est rare.

#### 1.2.1.3.5. Diagnostic

Les **signes d'appels majeurs** conduisant à rechercher la présence d'IPI dans le troupeau sont (RAVARY-PLUMIOEN B. *et al.*, 2020) :

- Une **série d'avortements** ;
- Une **série de veaux porteurs d'anomalies congénitales** ;
- Des **veaux faibles ou des retards de croissance** ;
- Un **syndrome hémorragique**.

Un cas de **maladie des muqueuses aiguë ou chronique** doit être suffisant pour déclencher une recherche des IPI (BELBIS G., 2017).

D'autres **signes d'appel mineurs** doivent conduire à rechercher une circulation du virus dans l'élevage comme de **l'infécondité** (retours en chaleur avec interoestrus longs), des **diarrhées aiguës chez des bovins adultes** et des **diarrhées néonatales** (en dehors des étiologies classiques) (BELBIS G., 2017).

D'un point de vue de diagnostic de laboratoire, les outils disponibles sont résumés dans le tableau 3 ci-dessous (BELBIS G., 2017 ; RAVARY-PLUMIOEN B. *et al.*, 2020) :

	<b>Technique</b>	<b>Matrice</b>	<b>Individuel ou mélange</b>
<u>Diagnostic direct :</u> Virologie	Antigénémie : - ELISA antigène NS3 - ELISA antigène E0	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sang total (ou sérum pour E0)</li> <li>• Organes (rate, foetus)</li> </ul>	Analyses individuelles
	RT-PCR (quantitative ou en temps réel)	Sang, lait, organes (rate, foetus), sperme et fèces	Analyses individuelles ou de mélange
	Culture virale, immunofluorescence directe		
<u>Diagnostic indirect :</u> Sérologie	Sérologie ELISA anticorps totaux ou p80 Séroneutralisation Immunofluorescence directe	Sang ou lait de tank	Analyses individuelles ou de mélange

Tableau 3 : Moyens de diagnostic de la BVD (BELBIS G., 2017 ; RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020)

❖ **Quelles analyses choisir ? (BELBIS G., 2017)**

Le tableau 4 ci-après expose les analyses à choisir en fonction de la suspicion dans l'élevage et de l'âge de l'animal.

<u>Suspicion IPI</u>	Animal de moins d'un jour ou de plus de 6 mois	Recherche du virus : - Antigénémie (E0 ou NS3) - RT-PCR Sérologie ELISA
	Animal de plus d'un jour et de moins de 6 mois	Recherche du virus : - RT-PCR - Antigénémie E0 après l'âge d'un mois Sérologie ELISA non utilisable (Ac colostraux)
<u>Suspicion Maladie des Muqueuses</u>	Animal de plus de 6 mois	Recherche du virus : - Antigénémie (E0 ou NS3) - RT-PCR Sérologie ELISA
	Animal de moins de 6 mois	Recherche du virus : - RT-PCR - Antigénémie E0 après l'âge d'un mois Sérologie ELISA non utilisable (Ac colostraux)
<u>IPI détecté dans l'élevage et on veut tester le reste du troupeau</u>	Bovins de plus de 6 mois	Sérologie NS3 de tous les animaux puis RT-PCR ou antigénémie de tous les séronégatifs RT-PCR sur lait de tank ou mélange de sérums
	Bovins de moins de 6 mois	RT-PCR sur mélange de sang (et tester les mélanges positifs en individuel)
<u>Signes d'appel mineurs dans le troupeau et on veut rechercher un passage viral récent</u>	Sérologie sur un échantillon : - Non vaccinés - Suffisamment âgés pour ne pas avoir d'Ac colostraux - Suffisamment jeunes pour ne pas avoir d'Ac d'un ancien passage viral → Dizaine d'animaux sentinelles de 8 à 18 mois.	
<u>Contrôles à l'introduction</u>	- RT-PCR - Sérologie NS3 et test RT-PCR si animal séronégatif Si achat d'une vache gestante séronégative et RT-PCR négative, penser à tester le veau à la naissance	

Tableau 4 : Quelles analyses choisir pour le diagnostic de la BVD ?(BELBIS G., 2017)



### 1.2.1.3.6. Bilan

Le bilan au sujet du virus de la BVD est rassemblé dans le tableau 5 ci-dessous.

#### DIARRHÉE VIRALE BOVINE (BVD)

Caractéristiques du virus	Physiopathologie	Épidémiologie
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Flaviviridae</i> du genre <i>Pestivirus</i> enveloppé à ARN simple brin positif</li> <li>• Protéines E0 (antigénémie) et E2 (Ac neutralisants), NS3 (ELISA)</li> <li>• 2 biotypes : cytopathogène (CP) et non cytopathogène (NCP)</li> <li>• 2 géotypes : I et II</li> </ul>	<p><b><u>Infection transitoire :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pénétration via une muqueuse (oro-nasale, conjonctivale ou génitale)</li> <li>• Voie respiratoire : dissémination via drainage lymphatique ; sinon virémie libre et associée aux cellules mononucléées sanguines</li> <li>• Excrétion horizontale via sécrétions nasales et matières virulentes ou transmission verticale pouvant entraîner mortalité embryonnaire, malformations, avortements, formation d'un IPI</li> </ul> <p><b><u>IPI :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infection <i>in utero</i> entre le 30<sup>ème</sup> et le 125<sup>ème</sup> jour de gestation par une souche NCP</li> <li>• Charge virale majeure et excrétion tout au long de leur vie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dans le monde entier</li> <li>• France : 1% d'IPI, 15 à 30% de troupeaux comportant au moins 1 IPI, 36-88% de séropositifs</li> <li>• Sources de virus : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Espèces hôtes (IPI, infectés transitoires)</li> <li>- Environnement</li> <li>- Matières virulentes</li> </ul> </li> <li>• Pertes multiples pour l'élevage : troubles de la reproduction, baisse de la production laitière, réforme et mortalité, frais vétérinaires</li> </ul>
	<b>Signes cliniques</b>	<b>Diagnostic</b>
<b><u>Infecté transitoire :</u></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Forme subclinique</u></li> <li>• <u>Forme entérique</u> : fièvre, abattement, anorexie, diarrhée, toux et jetage nasal, stomatite ulcéreuse</li> <li>• <u>Forme hémorragique</u> : destruction des plaquettes circulantes, hyperthermie marquée, saignements multiples → issue fatale</li> <li>• <u>Forme reproductive</u> : fertilité diminuée chez les femelles, infertilité transitoire chez les taureaux. IPI normalement fertiles, peu fertiles ou stériles de manière permanente. Troupeau : retour en chaleurs irréguliers (mortalité embryonnaire tardive).</li> <li>• <u>Si femelle gestante</u> : atteinte système nerveux central ou atteinte oculaire de l'avorton ou du nouveau-né</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Direct</u> : Antigénémie (ELISA sang total ou organes), RT-PCR (sang, lait, organes, sperme et fèces), Culture virale, immunofluorescence directe</li> <li>• <u>Indirect</u> : sérologie ELISA, séroneutralisation, immunofluorescence directe (sang ou lait de tank).</li> </ul>

## IPI :

- Retard de croissance et sensibilité augmentée aux infections digestives et respiratoires (généralement meurt avant 2 ans)
- Possible développement normal et durée de vie normale
- Maladie des muqueuses

Tableau 5 : Bilan sur la Diarrhée Virale Bovine

### 1.2.1.4 Virus Respiratoire Syncytial Bovin (VRS)

#### 1.2.1.4.1. Caractéristiques du virus

Le VRS est un virus à **ARN monocaténaire** appartenant à la famille des **Paramyxoviridae** du genre **Pneumovirus** (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020). Il s'agit d'un **virus enveloppé à ARN monocaténaire négatif** (VALARCHER ET TAYLOR, 2007).

Le virus contient **2 protéines non structurales NS1 et NS2** qui vont pouvoir être détectées lors de la recherche du virus. Ce sont toutes deux des protéines qui **vont diminuer la production d'IFN1** et donc permettre **d'échapper aux mécanismes de défense de l'appareil respiratoire**. (VALARCHER et TAYLOR, 2007 ; SCHELCHER, 2021).

Il possède également différentes **protéines structurales** : plusieurs protéines associées à la **nucléocapside** (une nucléoprotéine, une phosphoprotéine et une polymérase L), des **protéines de matrice**, et plusieurs **protéines d'enveloppe** (SH, F, G) (VALARCHER ET TAYLOR, 2007 ; SCHELCHER, 2021)

Les caractéristiques du virus du VRS sont illustrées sur la figure 7 ci-dessous.

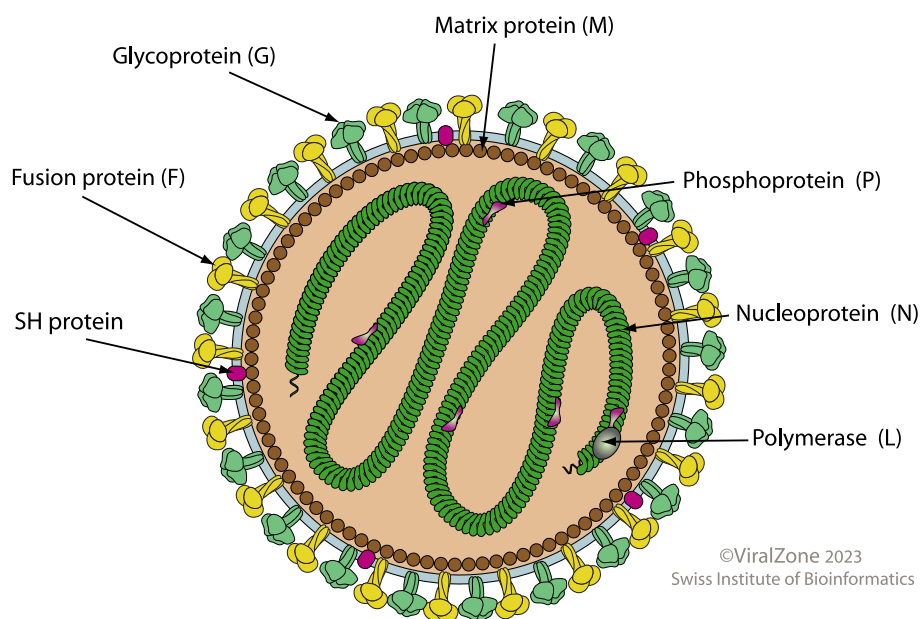


Figure 7 : Représentation schématique du VRS (VIRALZONE, 2023d)

#### 1.2.1.4.2. Physiopathologie

Le virus se transmet par **voie aérienne**. Il se multiplie alors dans la muqueuse nasale, pharyngée, trachéale et pulmonaire. Il est **retrouvé pendant 4 à 10 jours dans les poumons** et se situe d'abord dans les bronches puis dans les alvéoles : il se multiplie dans l'épithélium ciliaire, les pneumocytes de type II et les macrophages alvéolaires. (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020)

Le virus possède plusieurs protéines qui vont avoir différents rôles dans sa physiopathologie (VALARCHER ET TAYLOR, 2007 ; SCHELCHER, 2021) :

- La **protéine NS** agit sur la **diminution de la production de cytokines** permettant une meilleure infection de l'animal contaminé ;
- La **protéine SH diminue la réponse immunitaire innée** ;
- La **protéine G** soluble **diminue les effets du surfactant** et joue le rôle de **leurre** pour les anticorps neutralisants ;
- La **protéine F** provoque une **bronchoconstriction** surajoutée aux contractions médiées par la réaction inflammatoire et joue alors un rôle de **virokine**.

Ainsi, on peut déterminer une **action directe et indirecte** de l'infection par le VRS sur l'appareil respiratoire (SCHELCHER, 2021) :

- Une action directe : le VRS **colonise l'appareil respiratoire**, créant une **inflammation** tout en **échappant partiellement aux défenses de l'appareil respiratoire**. Ainsi, on observe une nécrose cellulaire de l'épithélium bronchique et alvéolaire avec une diminution de l'épuration muco-ciliaire accompagnée par une infection des macrophages alvéolaires.
- Une action indirecte : l'infection par le VRS **favorise les co-infections virales ou bactériennes** suite aux perturbations qu'il engendre dans le système immunitaire

#### 1.2.1.4.3. Épidémiologie

Les **bovins sont l'hôte naturel du virus** mais d'autres espèces comme les ovins, les caprins, les chamois et les camélidés peuvent également être porteurs (VALARCHER ET TAYLOR, 2007).

La **distribution du virus est mondiale** et il a été isolé en Europe, Amérique et Asie (SCHELCHER, 2021). Le VRS est la **cause la plus fréquente en Europe de pneumopathie** chez les jeunes. La fréquence d'infection est très élevée et le virus est responsable de plus de 60% des maladies respiratoires chez les bovins laitiers et 70% chez les bovins allaitants (VALARCHER ET TAYLOR, 2007 ; RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

La fréquence d'infection est directement **corrélée à la densité animale dans l'élevage et à l'âge des individus** (VALARCHER ET TAYLOR 2007) : l'infection touche préférentiellement les animaux de 15 jours à 18 mois avec une préférence pour les animaux âgés de 2 mois (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020). Les cas cliniques sont le plus souvent diagnostiqués en climat tempéré **en automne et en hiver** même s'il est possible d'en retrouver également en été (VALARCHER et TAYLOR, 2007 ; RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020)

Les animaux sont contaminés par **contact direct ou via inhalation d'aérosols** provenant d'animaux malades ou infectés asymptomatiques (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020). De plus, il est possible que le virus soit également transmissible via le matériel (VALARCHER ET TAYLOR, 2007).

#### 1.2.1.4.4. Signes cliniques

Lorsque le virus se retrouve dans un troupeau, l'infection peut prendre une allure **épizootique** (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020). La **morbidity du VRS peut atteindre 60 à 80%** et la **mortalité peut monter à 20%** (VALARCHER ET TAYLOR, 2007).

**L'incubation dure entre 2 et 5 jours**, puis l'animal infecté peut être **asymptomatique**, avec une **infection limitée au haut appareil respiratoire** ou avec une **infection concernant l'ensemble de l'appareil respiratoire** (VALARCHER ET TAYLOR, 2007).

Lors de l'atteinte du haut appareil respiratoire, on peut observer une toux avec un **jetage nasal** et **oculaire séromuqueux**. (VALARCHER ET TAYLOR, 2007). Lorsque l'infection concerne l'ensemble de l'appareil respiratoire, les signes cliniques sont ceux d'une infection sévère avec une **dépression**, une **anorexie**, une **baisse de production laitière**, une **hyperthermie**, une **polypnée**, **dyspnée** et/ou **orthopnée** avec **ptyalisme** associé (VALARCHER ET TAYLOR, 2007).

De plus, lors d'atteinte sévère, un **emphysème** et un **œdème pulmonaire** peuvent être présents. L'emphysème pulmonaire est la conséquence de la rupture d'alvéoles pulmonaires. Il peut également être accompagné d'un emphysème sous-cutané localisé au niveau du garrot de l'animal ce qui donnera cliniquement une déformation de la zone et des crépitements à la palpation de la peau (VALARCHER ET TAYLOR, 2007 ; RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

A l'autopsie, une infection pure par le VRS provoquera des **lésions de pneumonie broncho-interstitielle**. On observera les parties cranio-ventrales des poumons avec une induration modérée, une coloration rouge à gris violine et les parties caudo-dorsales souvent distendues à cause d'emphysème pulmonaire. On retrouvera dans la trachée, les bronches et les bronchioles du mucopus (VALARCHER ET TAYLOR, 2007 ; RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

#### 1.2.1.4.5. Diagnostic

Plusieurs modalités de diagnostic sont possibles :

- une **identification directe** du pathogène à partir de prélèvements : **ATT, LBA** (Lavage Broncho-Alvéolaire) et **ENP** (l'ATT et le LBA étant plus fiables (SCHELCHER, 2021)). Le virus est mis en évidence par **PCR**, par **immunochromatographie**, par **immunofluorescence** ou par **culture virale**. Cependant, le virus n'est **détectable que dans les premiers jours de l'infection** donc les animaux prélevés doivent l'être au tout début des symptômes, pendant la phase d'hyperthermie (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

Il faut cependant être vigilant lors de l'utilisation d'un vaccin vivant atténué par voie intranasale car il peut conduire à la détection de virus vaccinal sur les ENP jusqu'à 14 jours après administration (SCHELCHER, 2021).

- Une **identification indirecte** du pathogène : on recherche une **augmentation significative des titres en anticorps à partir de 2 prises de sang à 2-3 semaines d'intervalle** (la 1<sup>ère</sup> prise de sang étant réalisée en phase d'hyperthermie). Ainsi, une élévation du titre d'anticorps signifiera que la clinique était au moins due en partie au VRS (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

### 1.2.1.4.6. Bilan

Le bilan au sujet du VRS est rassemblé dans le tableau 6 ci-dessous.

#### VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN (VRS)

Caractéristiques du virus	Physiopathologie	Épidémiologie
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Paramyxoviridae</i> du genre <i>Pneumovirus</i> enveloppé à ARN monocaténaire négatif.</li> <li>• Protéines NS, SH, G, F</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Entrée dans organisme</u> : voie aérienne (contact direct, aérosols)</li> <li>• <u>Cellules cibles</u> : épithélium ciliaire, pneumocytes II, macrophages alvéolaires</li> <li>• Échappement partiel au système immunitaire</li> <li>• Favorise les co-infections bactériennes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Automne/Hiver voire Été</li> <li>• Corrélation de l'infection avec la densité et l'âge : <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bovins de 15 jours à 18 mois (2 mois ++)</li> </ul> </li> </ul>
<h4>Signes cliniques</h4> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Asymptomatique</li> <li>• Infection limitée au haut appareil respiratoire : toux, jetage nasal et oculaire séromuqueux</li> <li>• Infection de l'ensemble de l'appareil respiratoire : dépression, anorexie, baisse production laitière, hyperthermie, polypnée, dyspnée et/ou orthopnée avec ptyalisme</li> <li>• Possible œdème pulmonaire et/ou emphysème pulmonaire et/ou sous cutané</li> </ul>		<h4>Diagnostic</h4> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Direct : ATT, LBA (ou ENP) : PCR, immunochromatographie, immunofluorescence, culture virale</li> <li>• Indirect : sérologie</li> </ul>

Tableau 6 : Bilan sur le Virus Respiratoire Syncytial Bovin

### 1.2.1.5 Coronavirus Bovin (BCoV)

#### 1.2.1.5.1. Caractéristiques du virus

Le Coronavirus bovin est un **virus enveloppé à ARN** appartenant à la famille des **Coronaviridae** (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020 ; VLASOVA ET SAIF 2021). Il s'agit d'un **virus pneumo-entérique** : il a été initialement associé aux diarrhées néonatales et à l'entérite hémorragique hivernale (winter dysentery) mais il a pu être isolé chez des animaux présentant des troubles respiratoires (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020 ; VLASOVA ET SAIF 2021).

Il est constitué de **16 protéines non structurales** et de **5 protéines majeures** (VLASOVA ET SAIF, 2021) :

- Protéines de la **nucléocapside (N)** : elles lient les éléments internes du virus à son enveloppe ;
- Protéines de la **membrane intégrale (M)** : forment l'enveloppe virale ;
- Protéines de la **petite membrane/enveloppe (E)** : forment l'enveloppe virale ;
- Protéine **Haemagglutininesterase (HE)** : aide à la fixation et à la destruction de certains récepteurs de l'acide sialique qui se trouve à la surface des cellules hôtes ;
- Protéine **Spike (S)** : forme les épitopes et aide à la fusion de membranes.

Les caractéristiques du BCoV sont illustrées sur la figure 8 ci-dessous.

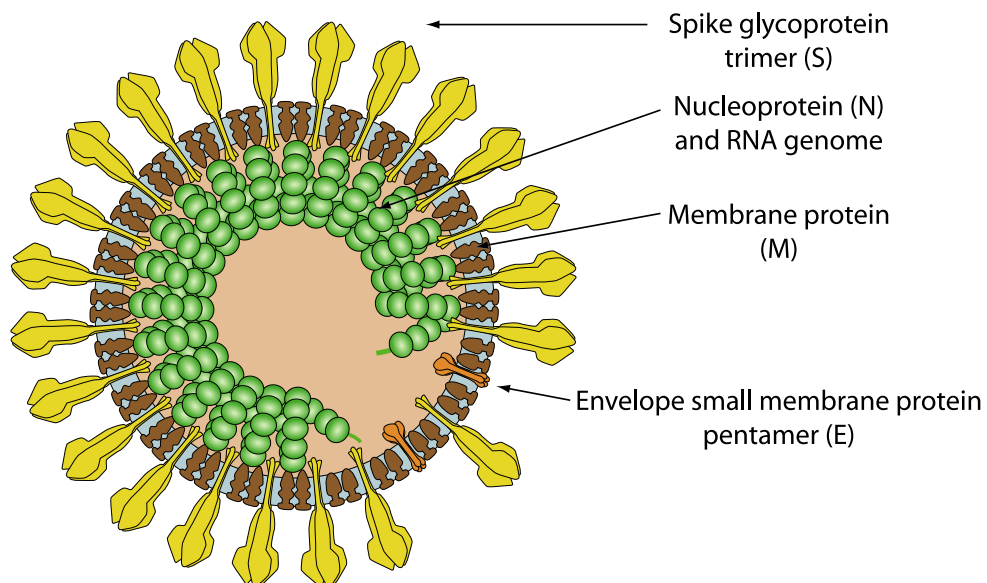


Figure 8 : Représentation schématique du BCoV (VIRALZONE, 2023e)

Le Coronavirus bovin est **impliqué dans 3 grands syndromes cliniques** : les **entérites néonatales**, la dysenterie hivernale (**winter dysentery**) chez l'adulte et des **affections respiratoires** chez le jeune veau et chez le jeune adulte (PELLETIER, 2021). Aucune caractéristique ne permet de différencier les virus entériques des virus respiratoires (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

Le Coronavirus bovin est **sensible aux détergents et solvants lipides** et est **facilement inactivé par les désinfectants habituels et la chaleur** (VLASOVA ET SAIF, 2021).

#### 1.2.1.5.2. Physiopathologie

Le BCoV **s'attache à des acides présents sur la membrane** des cellules cible grâce à la **protéine HE** et à la **protéine S** pour initier l'infection. Puis, la protéine S permet un **changement de conformation cellulaire** et la **fusion des membranes cellulaire et virale** (VLASOVA ET SAIF, 2021).

Les cellules cibles sont celle des **épithéliums**, de la **trachée** et des **poumons** et l'infection se fait par **voie aérogène, ou oro-fécale** (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020 ; PELLETIER, 2021).

#### 1.2.1.5.3.Épidémiologie

Le Coronavirus bovin se distribue **mondialement**. Il se répand massivement dans la population bovine et on retrouve des **anticorps contre celui-ci chez de très nombreux bovins**. Ce virus est plus connu pour son rôle dans des entérites plutôt que pour son action sur le système respiratoire. (CLARK, 1993). Le **réservoir** peut être chez les **veaux**, les **jeunes adultes** ou les **adultes infectés subcliniques et cliniques** (PELLETIER, 2021). Le BCoV atteint majoritairement les animaux **entre 2 et 16 semaines d'âge**. Il est plus prévalent pendant les **mois d'hiver**, ce qui reflète sa capacité à survivre dans des milieux froids et humides (CLARK, 1993).

La transmission du virus se fait par **voie oro-fécale ou via des aérosols** (CLARK, 1993).

Il a été montré expérimentalement que le coronavirus bovin peut affecter les **ruminants sauvages** et les **oiseaux**, ainsi, une piste de réflexion réside dans l'étude des réservoirs dans la faune sauvage qui peuvent être des sources de coronavirus et potentiellement d'infections pour les animaux d'élevage (PELLETIER, 2021).

#### 1.2.1.5.4.Signes cliniques

Lorsque le virus atteint l'appareil respiratoire supérieur, les signes cliniques observés sont une **rhinite, des éternuements, de la toux, un jetage nasal séreux, des larmolements...** (CLARK, 1993 ; RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

Lorsqu'il atteint le l'appareil respiratoire inférieur, il peut causer des **lésions pulmonaires mineures** mais les **signes cliniques sont généralement absents**. Ainsi, les infections par le coronavirus respiratoire ne sont pas suffisamment sévères pour recourir à un traitement mais elles **prédisposent les individus à de plus sévères infections respiratoires secondaires** (CLARK, 1993).

Les signes cliniques les plus souvent observés sont de **la fièvre et de l'abattement, une dyspnée**, et on peut parfois observer une **diarrhée associée** (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2016 ; RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

#### 1.2.1.5.5.Diagnostic

Étant donné que le virus ne reste pas longtemps dans les voies respiratoires en l'absence de surinfection bactérienne, il est **délectable de façon directe lors de la phase aiguë** aussi bien sur **ENP, ATT** et dans les **poumons** par **RT-PCR** principalement (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020 ; PELLETIER, 2021).

De plus, étant donné que les coronavirus bovins respiratoires et digestifs possèdent une forte homologie génétique, il est possible d'utiliser les **tests pour le diagnostic des coronaviroses digestives pour le dépistage du coronavirus respiratoire bovin** (PELLETIER, 2021).

### 1.2.1.5.6. Bilan

Le bilan au sujet du BCoV est rassemblé dans le tableau 7 ci-dessous.

#### CORONAVIRUS BOVIN (BCoV)

<p><b>Caractéristiques du virus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Coronaviridae</i> enveloppé à ARN.</li> <li>• Protéines NS, N, M, E, HE, S</li> <li>• Responsable d'entérites néonatales, de la winter dysentery chez l'adulte et d'affections respiratoires chez le jeune veau et le jeune adulte.</li> </ul>	<p><b>Physiopathologie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Entre dans la cellule grâce aux protéines HE et S</li> </ul>	<p><b>Épidémiologie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mondialement</li> <li>• Réservoir chez veaux, jeunes adultes ou adultes infectés subcliniques et cliniques</li> <li>• Bovins âgés entre 2 et 16 semaines</li> <li>• Prévalent durant les mois d'hiver</li> </ul>
<p><b>Signes cliniques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infection limitée au haut appareil respiratoire : rhinite, éternuements, toux, jetage séreux, larmolement</li> <li>• Infection du bas appareil respiratoire : lésions pulmonaires mineures mais prédispose à des surinfections</li> <li>• Fièvre, abattement, dyspnée et parfois diarrhée associée</li> </ul>		<p><b>Diagnostic</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Direct : ENP, ATT, poumons par RT-PCR, Tests antigéniques coronaviroses digestives</li> </ul>

Tableau 7 : Bilan sur le Coronavirus Bovin

### 1.2.2 Agents pathogènes respiratoires bactériens

Les agents pathogènes respiratoires bactériens peuvent se classer en deux catégories : les **pasteurelles pulmonaires** et les **mycoplasmes**.

#### 1.2.2.1 Pasteurelles pulmonaires

Les pasteurelloses pulmonaires bovines sont causées majoritairement par 3 bactéries Gram - : ***Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* et *Histophilus somni*** (PANCIERA ET CONFER, 2010 ; RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020). Ces bactéries sont **commensales des cavités nasales** des ruminants et développent généralement leur pouvoir pathogène après une première infection par un virus respiratoire. Cependant, dans certains cas, ces bactéries peuvent développer leur propre pouvoir pathogène sans intervention d'un agent primaire (PANCIERA ET CONFER, 2010 ; RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

##### 1.2.2.1.1 Physiopathologie

Les animaux se contaminent par **voie aérienne** des animaux les plus âgés vers les animaux les plus jeunes. Les bactéries se retrouvent dans les cavités nasales et en particulier dans le nasopharynx. Puis, lorsqu'une première infection permet la surinfection bactérienne ou lorsque les conditions sont favorisantes, les bactéries vont se multiplier localement et envahir les poumons en gagnant les alvéoles à partir des bronches et des bronchioles (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).



Chaque bactérie possède des **caractéristiques** qui vont être responsables de leur **pathogénicité** et de leurs **lésions spécifiques** comme résumé dans le tableau 8 ci-après (PANCIERA ET CONFER, 2010).

Bactérie	Capsule	Endotoxine	Protéines d'adhésion	Enzymes sécrétées	Autres facteurs
<b><i>Mannheimia haemolytica</i></b>	Oui	LPS (lipopolysaccharide) LKT (leukotoxin)	OmpA (Outer membrane protein A) Lipoprotéine I N-actéyl-D-glucosamine Fibrinogen-binding proteins	Neuraminidase Sialoglycoprotéine	Biofilm
<b><i>Pasteurella multocida</i></b>	Oui	LPS <i>P. multocida</i> toxin (rare)	OmpA Type IV fimbriae FHA (filamentous hemagglutinin)	Neuraminidase	Biofilm
<b><i>Histophilus somni</i></b>	Non	LOS (lipooligosaccharide)	/	/	Biofilm IgBPs (immunoglobulin-binding proteins)

Tableau 8 : Facteurs de virulence des pasteurelles pulmonaires (PANCIERA ET CONFER, 2010)

Ainsi, lors d'une **infection par *P. multocida* ou *M. haemolytica***, on aura (RAVARY-PLUMIOËN B. et al., 2020) :

- Une accumulation importante de leucocytes et de fibrine dans les alvéoles. On peut alors parler de **pneumonie alvéolaire**.
- Une production de fibrine qui va conduire à la formation d'une pleurésie. On peut alors parler de **pleuropneumonie**.
- La leucotoxine LKT de *M. haemolytica* produira en plus des lésions endothéliales vasculaires, ce qui va favoriser le développement d'une **nécrose de coagulation**.

Lors d'une infection par *H. somni*, la présence du LOS induit de **l'inflammation**, **l'apoptose** des cellules endothéliales, des lésions de **vascularite**, de **thrombose** et de **microhémorragies**. Elle induit également la production **d'histamine** qui induit une **vasoconstriction** et une **perméabilité bronchiolaire**, ce qui va favoriser les lésions pulmonaires (PANCIERA ET CONFER, 2010 ; RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020). Au final, la bactérie sera responsable (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020) :

- Des formes graves avec **pleurésie fibrineuse**.
- D'une bactériémie conduisant à des **encéphalites**, des **arthrites** et des **myocardites**.

#### 1.2.2.1.2 Epidémiologie

*M. haemolytica* était la plus fréquente jusqu'en 1995, puis *P. multocida* est devenue **prépondérante** dans les affections respiratoires bovines (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

#### 1.2.2.1.3 Signes cliniques

Que l'infection soit primaire ou secondaire, les pasteurelloses pulmonaires vont causer des **bronchopneumonies** avec présence de **foyers pulmonaires purulents** voire des **troubles vasculaires**. On va alors pouvoir entendre à l'auscultation pulmonaire de fortes modifications des bruits respiratoires avec des **crépitations humides**, la **disparition du murmure vésiculaire**, des **sifflements laryngo-trachéaux** (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

De plus, on retrouvera des **signes cliniques caractéristiques de maladies respiratoires** : abattement, dysorexie voire anorexie, hyperthermie en début d'évolution, une dyspnée initialement expiratoire puis mixte, un jetage muco-purulent (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

A l'autopsie, les lésions retrouvées seront des **lésions de pneumonie alvéolaire** (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020) :

- Lors d'infection par *P. multocida* ou *H. somni*, on retrouvera une **coloration rouge sombre à noirâtre**, une **consolidation** marquée des lobes atteints (souvent cranio-ventraux), un **épanchement séro-fibrineux pleural et interlobulaire**, une **pleurésie**.
- Lors d'infection par *M. haemolytica*, on retrouvera en plus des lésions précédentes une **nécrose de coagulation**, une extension des **lésions de consolidation caudo-dorsalement** et une **pleurésie** plus marquée.

#### 1.2.2.1.4 Diagnostic

Étant donné que les pasteurelloses respiratoires sont causées par des bactéries commensales de l'appareil respiratoire, il ne sera pas possible de diagnostiquer une pasteurellose respiratoire grâce à un ENP. Il faudra réaliser un **prélèvement plus profond dans l'arbre respiratoire comme une ATT ou un LBA** sur lequel on pourra réaliser une **culture bactérienne** ou une **PCR**, chacune ayant leurs avantages et inconvénients comme résumés dans le tableau 9 ci-dessous (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020):

	Avantages	Inconvénients
<b>Culture bactérienne</b>	Permet ensuite de réaliser un antibiogramme	Diagnostic d' <i>H. somni</i> compliqué car pousse difficilement  Nécessite l'utilisation de milieux spécifiques et d'une atmosphère enrichie en CO <sub>2</sub>
<b>PCR</b>	Technique extrêmement sensible	Ne permet pas la réalisation d'un antibiogramme

Tableau 9 : Avantages et inconvénients de la culture bactérienne et de la PCR dans le diagnostic des pasteurelloses respiratoires

### 1.2.2.1.5 Bilan

Le bilan au sujet des pasteurelloses pulmonaires est rassemblé dans le tableau 10 ci-dessous.

## PASTEURELLOSES PULMONAIRES

Caractéristiques des bactéries	Physiopathologie	Épidémiologie
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Pasteurella multocida</i>, <i>Mannheimia haemolytica</i> et <i>Histophilus somni</i></li> <li>• Commensales des cavités nasales</li> <li>• Pouvoir pathogène suite à une première infection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contamination par voie aérienne des animaux les plus âgés vers les plus jeunes</li> <li>• Capsules, toxines et enzymes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>M. haemolytica</i> prépondérante jusqu'en 1995 puis <i>P. multocida</i></li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Signes cliniques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bronchopneumonie avec foyers pulmonaires purulents voire troubles vasculaires : forte modification des bruits respiratoires</li> <li>• Signes caractéristiques de maladies respiratoires : abattement, dysorexie/anorexie, hyperthermie, dyspnée, jetage muco-purulent</li> <li>• Lésions : <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>P. multocida</i> et <i>H. somni</i> : coloration rouge sombre/noirâtre, consolidation marquée, épanchement séro-fibrineux pleural et interlobulaire et pleurésie</li> <li>- <i>M. haemolytica</i> : idem + nécrose de coagulation, extension lésions de consolidation caudo-dorsalement, pleurésie plus marquée</li> </ul> </li> </ul>		<p style="text-align: center;"><b>Diagnostic</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ATT ou LBA</li> <li>• Culture bactérienne ou PCR</li> </ul>

Tableau 10 : Bilan sur les Pasteurelloses pulmonaires

### 1.2.2.2 Mycoplasmes : *Mycoplasma bovis*

Les mycoplasmes sont souvent mis en cause lors d'affections respiratoires chez les bovins. On ne connaît pas encore bien leur rôle mais ils sont souvent considérés comme des **agents pathogènes potentialisateurs**, c'est-à-dire permettant les infections respiratoires secondaires sans affecter directement le système respiratoire (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020). Le principal mycoplasme rencontré chez les bovins est *Mycoplasma bovis*, et dans une moindre mesure on peut retrouver *Mycoplasma dispar*, ou encore *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides Small Colony* qui est l'agent de la péripneumonie contagieuse bovine (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

#### 1.2.2.2.1. Physiopathologie

Les mycoplasmes sont des bactéries appartenant à la classe des **Mollicutes** et au genre *Mycoplasma*. (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020). Elles possèdent des caractéristiques qui vont être responsables de leur pathogénicité et de lésions spécifiques comme résumé dans le tableau 11 ci-dessous (PANCIERA ET CONFER, 2010) :

Bactérie	Capsule	Endotoxine	Protéines d'adhésion	Enzymes sécrétées	Autres facteurs
<i>Mycoplasma bovis</i>	Non	Non	VSPs	/	Biofilm Peroxyde d'hydrogène

Tableau 11 : Facteurs de virulence des mycoplasmes

Les **facteurs de virulence** de *Mycoplasma bovis* incluent **différentes protéines de surface** (VSPs) dont la fonction d'adhésion leur permet de coloniser les bronchioles lors d'infection. Ces protéines de surface sont également responsables d'une **variation phénotypique au cours de l'infection qui permet à la bactérie d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte** (PANCIERA ET CONFER, 2010).

*Mycoplasma bovis* est également capable de produire du **peroxyde d'hydrogène** qui permet une **peroxydation des lipides** de l'hôte et donc pourrait jouer un **rôle dans la genèse des lésions** (PANCIERA ET CONFER, 2010 ; RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

De plus, la bactérie est capable de produire un **biofilm**, ce qui lui permet de **résister au système immunitaire et antimicrobien** de l'hôte et donc de permettre sa colonisation (PANCIERA ET CONFER, 2010).

#### 1.2.2.2.2. Epidémiologie

*Mycoplasma bovis* est une espèce **très pathogène** du tractus respiratoire des bovins et se retrouve **partout dans le monde**. Du fait des pertes économiques associées, *M. bovis* joue un rôle prépondérant dans le complexe respiratoire bovin (THOMAS A. et LINDEN A., 2003).

De plus, ce sont les **animaux âgés de moins de 1 an** qui sont les plus souvent infectés par *M. bovis*, probablement du fait de l'immaturation de leur système immunitaire et des stress qui peuvent être imposés au jeune bétail (THOMAS A. et LINDEN A., 2003).

### 1.2.2.3. Signes cliniques

Les mycoplasmoses peuvent être responsables de différentes catégories de signes cliniques : **respiratoires, articulaires, mammaires** ou encore **génitaux** (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

Les signes cliniques respiratoires **ne sont pas pathognomoniques** d'une infection à mycoplasme. On retrouve majoritairement des **signes de bronchopneumonie** (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020) avec du jetage, de la toux et de la dyspnée et des symptômes non spécifiques comme l'apathie, de l'anorexie, de l'amaigrissement, une absence de rumination et une hyperthermie (THOMAS A. et LINDEN A., 2003).

Cependant, des études ont pu décrire la lésion emblématique d'une infection à *M. bovis* : une **pneumonie à manchons péribronchiques lymphoplasmocytaires avec un léger exsudat contenant des neutrophiles et des macrophages dans les parties crânielles de poumons infectés** (THOMAS A. et LINDEN A., 2003).

Une autre caractéristique de l'infection à *M. bovis* est la **persistance de signes cliniques malgré l'administration de traitements antibiotiques classiques** comme la pénicilline ou la gentamicine (THOMAS A. et LINDEN A., 2003).

### 1.2.2.4. Diagnostic

Comme pour la pasteurellose, les mycoplasmes sont retrouvés chez les animaux sains dans leurs cavités nasales, donc le recours à des **prélèvements profonds comme l'ATT ou le LBA** sont nécessaires. Ces prélèvements seront analysés par **culture bactérienne** ou par **PCR**. (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

Un **diagnostic par sérologie** est également possible et permet de différencier les animaux porteurs sains qui ne produisent que très rarement d'anticorps des animaux atteints de pneumonie à mycoplasme. On va alors chercher à mettre en évidence une **augmentation significative des anticorps à partir de deux prises de sang réalisées à 2-3 semaines d'intervalles**, la première étant réalisée lorsque l'animal est malade (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

### 1.2.2.2.5. Bilan

Le bilan au sujet des mycoplasmoses pulmonaires est rassemblé dans le tableau 12 ci-dessous.

#### MYCOPLASMOSES PULMONAIRES

Caractéristiques des bactéries	Physiopathologie	Épidémiologie
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Mycoplasma bovis</i> (<i>Mycoplasma dispar</i>, <i>Mycoplasma mycoides subsp. mycoides Small Colony</i>)</li> <li>• Agents pathogènes potentialisateurs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protéines de surface VSPs : adhésion, variation phénotypique, échappement réponse immunitaire</li> <li>• Peroxyde d'hydrogène : lésions</li> <li>• Biofilm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>M. bovis</i> très pathogène</li> <li>• Répartition mondiale</li> <li>• Animaux de moins de 1 an +++</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>Signes cliniques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Atteinte respiratoire, articulaire, mammaire ou génitale</li> <li>- Bronchopneumonie, jetage, toux, dyspnée</li> <li>- Apathie, anorexie, amaigrissement, absence de rumination, hyperthermie</li> <li>- Lésion : pneumonie à manchons péribronchiques lymphoplasmocytaires avec léger exsudat contenant des neutrophiles et des macrophages dans les parties crânielles de poumons infectés</li> </ul>		<p style="text-align: center;"><b>Diagnostic</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ATT ou LBA</li> <li>• Culture bactérienne ou PCR</li> <li>• Sérologie</li> </ul>

Tableau 12 : Bilan sur les Mycoplasmoses pulmonaires

### 1.2.3 Agents pathogènes respiratoires parasitaires : dictyocaulose

Encore appelée « **bronchite vermineuse** » ou **strongylose respiratoire**, la dictyocaulose est une maladie respiratoire d'origine parasitaire de la trachée et des bronches du bovin due à un strongle : ***Dictyocaulus viviparus***. (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

#### 1.2.3.1 Physiopathologie

Le cycle évolutif de *Dictyocaulus viviparus* est un **cycle monoxène, sans hôte intermédiaire** très efficace et rapide. (CAMUSET P., 2021)

Le cycle évolutif de *Dictyocaulus viviparus* est résumé dans la figure 9 ci-dessous :

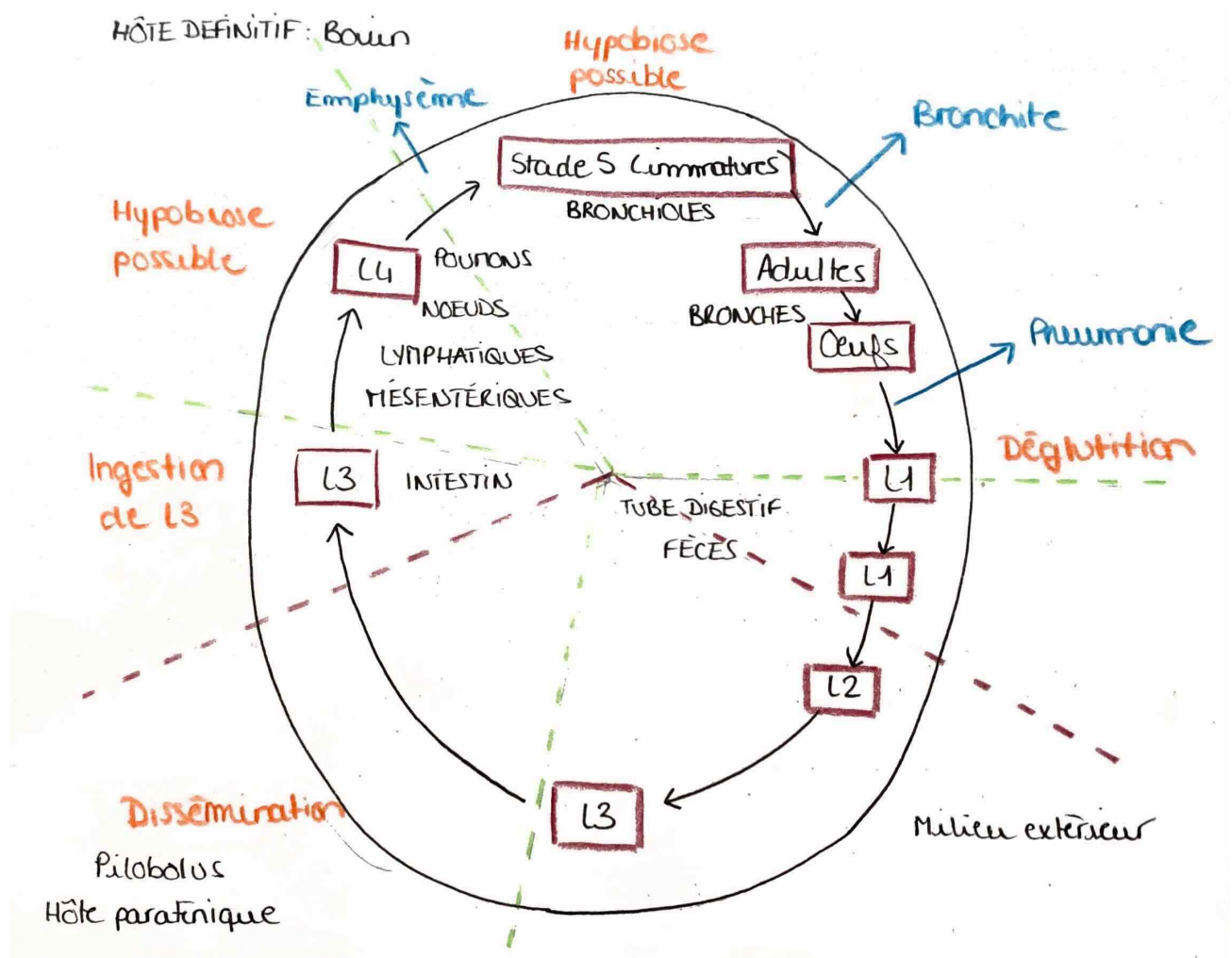


Figure 9 : Schéma du cycle évolutif de *Dictyocaulus viviparus* et ses conséquences cliniques (Dessin personnel, inspiré de GUERIN D., 2011)

La phase en milieu extérieur est rapide et dure entre 4 et 7 jours en fonction des conditions de température et d'humidité. Les œufs éclosent dans les voies respiratoires puis les larves L1 sont expulsées dans les fèces. Dans le milieu extérieur, les larves L1 passent au stade L2 puis L3. Puis, lors de la dissémination dans l'environnement, la larve L3 de *Dictyocaulus viviparus* gravit les champignons *Pilobolus kleinii* afin d'être éjectée parfois jusqu'à plusieurs mètres lors de la dissémination des spores. Lorsque les larves L3 sont ingérées, elles migrent de l'intestin aux poumons durant 22 jours. Le parasite **se reproduit alors pendant 40 à 60 jours dans les poumons** et poursuit son cycle (GUERIN D., 2011).

### 1.2.3.2 Épidémiologie

La dictyocaulose est **omniprésente en Europe, en Suède et au Portugal** à partir du moment où le climat assure un minimum d'humidité (CAMUSET P., 2021).

La femelle *Dictyocaulus viviparus* est très prolifique et **pond environ 40 000 œufs par jour**. En sachant qu'il suffit de **200 dictyocauls pour observer des signes cliniques** chez les bovins, une femelle dictyocaula peut donc faire tousser 200 bovins par jour (CAMUSET P., 2021).

Plusieurs schémas épidémiologiques sont possibles (GUERIN D., 2011 ; CAMUSET P., 2021) :

- Un **épisode clinique précoce de printemps** lorsque la **contamination résiduelle est très importante**, lorsque les **conditions hivernales sont très propices à la conservation des larves** dans les pâtures et qu'il y a eu l'année précédente un épisode clinique fortement contaminant pour la pâture et entraînant un plus grand nombre d'animaux porteurs latents ;
- Un **épisode de printemps tardif** lorsque la **contamination résiduelle est élevée** et que les **conditions hivernales ont été propices à la conservation des larves** dans les pâtures. Durant l'hiver, on peut constater une **diminution de l'immunité** des animaux face au dictyocauls ce qui permet une **contamination importante** entraînant un **épisode clinique 1 à 2 mois après la mise à l'herbe** ;
- Un **épisode clinique d'été ou d'automne (plus tardif)** lorsque la **contamination résiduelle est faible ou presque nulle** ou lorsque **l'hiver a été rigoureux**. Ici, les porteurs latents du troupeau vont ensemercer le pâturage et les animaux dont l'immunité est la plus faible vont permettre le cycle parasitaire. En effet, en cas d'infestation enzootique avec un contact régulier avec le parasite, la résistance du troupeau sera plus importante et les épisodes cliniques seront plus tardifs.

### 1.2.3.3 Signes cliniques

L'accumulation de vers dans les bronches va causer une **inflammation** et une **sécrétion excessive de mucus** qui vont se traduire par deux symptômes majeurs : une **toux** caractéristique et une **diminution de production laitière**. On observera une auscultation anormale de type « asthme », des complications rapides en broncho-pneumonies et une allure contagieuse de la maladie (CAMUSET P., 2021).

### 1.2.3.4 Diagnostic

Le diagnostic de la dictyocaulose repose sur la **mise en évidence des larves de stade 1** dans les fèces par **coprologie** qui peut se faire sur prélèvements individuels ou de mélange par la technique de Mac Kenna (Baermann simplifié) (GUERIN D., 2011 ; CAMUSET P., 2021).



### 1.2.3.5 Bilan

Le bilan au sujet de la dictyocaulose est rassemblé dans le tableau 13 ci-dessous.

#### DICTYOCAULOSE

Caractéristiques du parasite	Physiopathologie	Épidémiologie
<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Dictyocaulus viviparus</i></li><li>• Cycle monoxène sans hôte intermédiaire très efficace et rapide</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Larves L3 infestantes qui migrent des intestins vers les poumons où le parasite devient adulte et se reproduit pendant 40 à 60 jours</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Europe, Suède et Portugal</li><li>• Femelle très prolifique</li><li>• Episode clinique précoce de printemps, de printemps tardif ou d'été/automne</li></ul>
Signes cliniques		Diagnostic
<ul style="list-style-type: none"><li>• Accumulation de vers → inflammation et sécrétion excessive de mucus</li><li>• Toux caractéristique, diminution de production laitière, auscultation de type « asthme », allure contagieuse</li></ul>		<ul style="list-style-type: none"><li>• Coprologie : larves L1</li><li>• De mélange ou individuel</li><li>• Mac Kenna (Baermann modifié)</li></ul>

Tableau 13 : Bilan sur la Dictyocaulose

### 1.3 Facteurs environnementaux et prédisposants aux maladies respiratoires chez les bovins

Les maladies respiratoires chez les bovins se développent lorsque des conditions particulières sont réunies au sein de l'animal pour permettre la croissance des différents agents pathogènes développés ci-dessus. En effet, on peut retrouver des **facteurs prédisposants** et des **facteurs environnementaux** qui vont permettre de **potentialiser les effets pathogènes de ces différents agents pathogènes**.

#### 1.3.1. Facteurs prédisposant aux maladies respiratoires chez les bovins

Nous avons vu précédemment que les caractéristiques anatomiques de l'appareil respiratoire chez les bovins font qu'ils sont **naturellement insuffisants respiratoires**. De plus, plus la masse corporelle de l'animal est importante, plus le rapport entre la fonctionnalité du poumon et la masse sera mauvais ; ainsi, pour les races à viande telles que les charolaises, les blanc-bleu-belges, leur **morphologie les prédispose aux maladies respiratoires**. De la même façon, les mâles qui sont souvent plus imposants que les femelles sont plus susceptibles de développer des maladies respiratoires (CENTRAVET, 2021).

**L'âge** est également un facteur prédisposant aux maladies respiratoires. En effet, avant l'âge d'un an, les **facteurs anatomiques induisent des conditions ventilatoires défavorables** et **l'immunité est plus faible** (CENTRAVET, 2021). De plus, lors de la mise en lots des jeunes bovins, ils vont subir **3 stress** différents :

- La **séparation** de l'environnement d'origine ;
- Le **sevrage** ;
- Le **transport**.

Ces stress cumulés vont être à l'origine d'une **diminution des concentrations en IgG**, en **lymphocytes** et en **glucose** qui vont illustrer **l'affaiblissement des défenses immunitaires**, lequel peut être profitable à divers agents pathogènes dont les agents pathogènes respiratoires et donc engendrer des maladies respiratoires (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

De plus, **l'introduction** de bovins provenant d'autres élevages pouvant potentiellement être porteurs asymptomatiques de pathogènes respiratoires pour lesquels les bovins du troupeau n'ont pas développé d'immunité peut, en relation avec cette baisse d'immunité, favoriser l'apparition de maladies respiratoires (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).

### **1.3.2. Facteurs environnementaux favorisant l'apparition de maladies respiratoires chez les bovins**

On constate que les maladies respiratoires sont plus présentes en **période hivernale**, ce qui coïncide avec la **mise en bâtiment** des troupeaux. Ces bâtiments peuvent présenter des caractéristiques pouvant favoriser l'apparition de maladies respiratoires comme (DARGENT C., 2011) :

- Une **mauvaise ambiance** du bâtiment : un renouvellement de l'air insuffisant entraînant une **humidité trop importante**, des **courants d'air**. Ceci entraîne des pertes thermiques élevées et induit une **diminution des IgA** (Immunoglobuline de type A) dans le poumon et une **diminution de l'activité des macrophages** et **lymphocytes**. Puis, une charge microbienne trop importante dans l'air pouvant profiter de cette baisse d'immunité (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020). Cette mauvaise ambiance du bâtiment peut aussi induire un **taux d'ammoniac trop important** qui va favoriser la **destruction de l'épithélium cilié bronchique** et peut favoriser les **spasmes bronchiques** pouvant ainsi favoriser l'apparition de maladies respiratoires (RAVARY-PLUMIOËN B. *et al.*, 2020).
- Une **hygiène défectueuse** : si la litière n'est pas assez renouvelée et/ou que la température est élevée, si le nettoyage et la désinfection des locaux ne sont pas faits.
- Un **changement atmosphérique brutal** : passage d'un temps froid et sec à un temps plus doux et humide. Le froid associé à l'humidité de l'air va induire une diminution de la ventilation pulmonaire et diminuer les caractéristiques du mucus bronchique ainsi que la sécrétion du surfactant, ce qui va limiter la résistance de l'organisme à la pénétration des agents pathogènes dans le poumon.
- Un **stress** lors du déplacement du troupeau des pâtures vers les bâtiments, des réallotements...

- Un **changement alimentaire** entre l'alimentation disponible en pâture et celle distribuée en bâtiment pouvant être à l'origine d'une acidose entraînant une moindre activité des macrophages alvéolaires.
- Une **irritation mécanique** provoquée par des poussières générées par exemple par un foin poussiéreux ou par une pailleuse.

## 2. Les différents prélèvements réalisés lors d'affection respiratoire chez les bovins et pertinence de leur utilisation en fonction des signes cliniques observés

Nous allons tout d'abord voir les différents prélèvements réalisables lors d'affection de l'appareil respiratoire chez les bovins, puis dans quelles circonstances ils sont utilisables.

### 2.1 Les différents prélèvements réalisés lors d'affection de l'appareil respiratoire chez les bovins

Il existe 4 prélèvements respiratoires chez les bovins : l'**écouvillonnage nasal profond**, l'**aspiration trans-trachéale**, le **lavage broncho-alvéolaire** et le **prélèvement de poumon**.

#### 2.1.1 L'écouvillonnage Nasal Profond

##### 2.1.1.1 Réalisation

❖ **Matériel nécessaire** (ZOETIS, ENVA, 2019)

Pour réaliser un ENP, le matériel nécessaire est le suivant :

- **Écouvillons secs** (bouchons rouges) pour la mise en évidence de la présence de virus
- **Écouvillons avec milieu de transport** pour la mise en évidence de la présence de bactéries
- **Papier** ou **compresses** pour le nettoyage des naseaux

❖ **Mode opératoire** (ZOETIS, ENVA, 2019)

Tout d'abord, on nettoie bien les naseaux.

L'opérateur peut alors mettre des gants à usage unique.

Ensuite, on **entre l'écouvillon dans les cornets dorsaux** puis on applique **plusieurs rotations contre la muqueuse** jusqu'à avoir du **mucus**, des **sécrétions** et, si on souhaite un prélèvement pour virologie, jusqu'à la **rosée sanguine**. La rosée sanguine **garantit la présence de cellules sur l'écouvillon**.

##### 2.1.1.2 Conditionnement et envoi au laboratoire

En fonction de l'analyse que l'on souhaite faire (bactériologie ou virologie), on place l'écouvillon :

- Dans un **milieu sec** ou un **milieu de transport** pour la **recherche bactériologique**. On pourra effectuer un **mélange de 3 prélèvements au maximum**. Le prélèvement devra être **conservé à 4°C** et **acheminé idéalement dans les 24h** suivant le prélèvement. On devra **éviter la congélation** de ces prélèvements.
- Dans un **milieu sec** ou **virocults** (dispositif de collecte et de transport spécialement adapté aux prélèvements de virologie) pour **l'analyse virologique**. On pourra effectuer un **mélange de 5 prélèvements au maximum**.

Si on souhaite effectuer une **recherche virologique par culture**, le prélèvement devra être **conservé sous couvert du froid positif pendant moins de 24h**, au-delà il devra être **congelé**. Si on souhaite effectuer une **recherche virologique par PCR**, le prélèvement pourra être **conservé pendant 24h à température ambiante**, jusqu'à **72h sous couvert du froid positif** et au-delà il devra être **congelé**.

(LABOCEA, s. d.)

Il faut **être précis** dans les analyses que l'on demande (bactériologie ou virologie), et **accompagner le prélèvement des commémoratifs** les plus précis possibles, des **signes cliniques** observés et du **nombre d'animaux** concernés par la maladie suspectée afin d'aider le laboratoire à répondre de la façon la plus efficace possible (ZOETIS, ENVA, 2019).

#### **BILAN : ECOUVILLONNAGE NASAL PROFOND**

- Prélèvement de mucus, cellules et de sécrétions nasales grâce à un écouvillon
- Conditionnement et envoi au laboratoire différents en fonction du type de recherche étiologique demandée

### **2.1.2 L'Aspiration Trans-Trachéale**

#### **2.1.2.1 Réalisation**

##### **❖ Matériel nécessaire** (ZOETIS, ENVA, 2019)

Pour réaliser une ATT, le matériel nécessaire est le suivant :

- Un **cathéter de 70 cm** de long
- Matériel nécessaire à une **anesthésie locale**
- **Sérum physiologique stérile** (50 à 60 mL)
- **Tube sec** pour récolter le prélèvement
- **Savon iodé, solution iodée et alcool** accompagnés de compresses

##### **❖ Mode opératoire**

- **Préparation du matériel et de l'animal** (ZOETIS, ENVA, 2019)

Le bovin doit être **contenu** : l'utilisation d'une cage de contention permet une contention optimale. Cependant, l'ATT peut également être faite avec le bovin au cornadis par exemple.

Une pince mouchette peut être placée sur l'animal pour permettre à l'aide de placer la tête de l'animal vers le haut.

Ensuite, on effectue une **tonte de la zone de prélèvement** se situant dans le 1/3 distal de l'encolure en partie ventrale.

A ce moment, l'opérateur peut porter des **gants à usage unique** pour favoriser l'asepsie de la zone. On effectue un **lavage de la zone de prélèvement à l'aide d'un savon iodé**.

On effectue ensuite une **anesthésie locale à l'aide de lidocaïne** en l'injectant en sous-cutanée au niveau de la zone où on va effectuer l'ATT. Il faut réaliser une **anesthésie locale traçante en étoile** (ou en carré) : injecter 1 mL crânialement à la zone de ponction, 1 mL caudalement et 1 mL dans les 2 côtés puis 1 mL dans la trachée.

Puis on passe à la réalisation d'un **scrub** avec une alternation d'une solution iodée et de compresses d'alcool répété 3 fois.

Enfin, on prépare une seringue de 50-60 mL de sérum physiologique. Et on déballe le cathéter chemisé.

▪ **Réalisation de l'ATT** (ZOETIS, ENVA, 2019)

La **pointe du trocart sera dirigée vers le haut et vers l'arrière de l'animal** afin d'éviter de couper le cathéter à la suite d'un mouvement de l'animal à cause de la pointe du trocart.

- 1) **Passage de la peau** avec le trocart du cathéter
- 2) **Passage de la trachée** entre 2 anneaux avec le trocart
- 3) Cathétérisme :  
**Faire progresser le cathéter dans le trocart** : durant cette étape, il est normal que l'animal se mette à tousser en raison des nombreux récepteurs trachéaux)
- 4) Lorsqu'on a inséré le cathéter suffisamment loin, on **injecte le sérum physiologique** puis on **ré-aspire le liquide du lavage**. On récupère rarement un volume d'environ 3 à 5 mL.
- 5) **Retrait du cathéter avec retrait préalable du trocart** pour éviter de couper le cathéter à l'intérieur à cause de l'aiguille du trocart
- 6) **Transfert du liquide d'aspiration dans un tube sec**

### 2.1.2.2. Conditionnement et envoi au laboratoire

Une fois le prélèvement réalisé, il faut le **conditionner** pour son envoi au laboratoire.

Là encore, il faut **être précis dans les analyses que l'on demande** (bactériologie ou virologie), et accompagner le prélèvement des **commémoratifs** les plus précis possibles, des **signes cliniques** observés et du **nombre d'animaux concernés** par la pathologie suspectée afin d'aider le laboratoire à répondre de la façon la plus efficace possible (ZOETIS, ENVA, 2019).

Les recommandations d'envoi sont variables en fonction de l'analyse demandée :

- **Pour une recherche bactériologique**, il est recommandé de conserver le liquide d'ATT dans un **tube sec ou avec milieu de transport**, que le prélèvement soit de **0,5 mL au minimum** et qu'il soit constitué d'un **mélange de 3 prélèvements au maximum**. Le liquide d'ATT doit être **conservé à 4°C** et acheminé idéalement dans les 24h suivant le prélèvement. Il faut **éviter la congélation** de ces prélèvements.
- **Pour une analyse virologique**, il est recommandé de conserver le liquide d'ATT dans un **tube sec**. Le prélèvement doit faire **2 mL** et être constitué d'un **mélange de 5 individus au maximum**.  
Si on souhaite effectuer une **recherche virologique par culture**, le prélèvement peut être conservé pendant **24h sous couvert du froid positif** et au-delà il doit être **congelé**. Si on souhaite effectuer une **recherche virologique par PCR**, le prélèvement peut être conservé 24h à température ambiante et **72h sous couvert du froid positif** ; au-delà, il doit être **congelé**.

(LABOCEA, s. d.)

#### **BILAN : ASPIRATION TRANSTRACHÉALE**

- Prélèvement de liquide pulmonaire à partir de la mise en place d'un trocart dans la trachée et son cathétérisme
- Conditionnement et envoi au laboratoire différents en fonction du type de recherche étiologique demandée

## 2.1.3 Le Lavage Broncho-Alvéolaire

### 2.1.3.1 Réalisation

#### ❖ **Matériel nécessaire** (ZOETIS, ENVA, 2019)

Pour réaliser un lavage broncho-alvéolaire, le matériel nécessaire est le suivant :

- **1 sonde naso-oesophagienne** MILA 240 cm, de volume mort de 50 mL
- Matériel nécessaire à **une sédation** de l'animal
- 50 à 100 mL de **sérum physiologique stérile**
- Une **seringue** de 50 mL pour injecter le sérum physiologique stérile dans la sonde
- **Tubes secs** pour récolter le liquide du LBA

#### ❖ **Mode opératoire**

- **Préparation du matériel et de l'animal** (ZOETIS, ENVA, 2019)

Le bovin doit être **contenu** : l'utilisation d'une cage de contention permet une contention optimale. Cependant, le LBA peut également être fait avec le bovin au cornadis par exemple.

Le bovin doit ensuite être **sédaté**. On lui **nettoie également les naseaux**

Puis, on **remplit la sonde avec du sérum physiologique stérile afin de combler le volume mort** et on remplit notre seringue de 50 mL de sérum physiologique stérile.

L'idéal est d'être 3 opérateurs :

- Le premier va **tenir la tête du bovin en extension** vers le haut
- Le deuxième va, à l'aide d'un torchon, **maintenir la bouche du bovin ouverte** en mettant le torchon au niveau des incisives de la mâchoire inférieure pour protéger la langue et, à l'aide d'un autre torchon, **maintenir la langue en traction et en abaissement hors de la cavité buccale du bovin.**
- Le troisième **effectuera le LBA**

- **Réalisation du LBA** (ZOETIS, ENVA, 2019)

L'opérateur **introduit la sonde dans la narine** droite ou gauche du bovin pendant que son aide maintient l'encolure tendue.

Lorsque la sonde avance, **l'animal doit tousser** ce qui indique que l'on passe bien dans la trachée.

Une fois que la sonde est en place, l'opérateur **injecte le sérum physiologique** à l'aide de la seringue **puis il ré-aspire ce liquide.**

Lors de la ré-aspiration du liquide, il est intéressant de **fractionner les prélèvements dans plusieurs tubes en fonction du moment où ils sont ré-absorbés.**

Une fois le prélèvement réalisé, la **sonde est retirée.**

### 2.1.3.2 Conditionnement et envoi au laboratoire

Une fois le prélèvement réalisé, il faut le conditionner et l'envoyer au laboratoire.

Il faut **être précis dans les analyses demandées** et il est préférable d'accompagner le prélèvement de **commémoratifs** les plus précis possibles : **quels animaux ont été prélevés**, leur **nombre**, leurs **signes cliniques** précis. Cela permet d'aider le laboratoire dans sa recherche d'agent pathogène.

En fonction de l'analyse demandée, le prélèvement doit être conservé de diverses manières :

- **Pour une analyse bactériologique**, le prélèvement doit être de **0,5 mL minimum** et acheminé sur **tube sec ou avec milieu de transport**. On peut mélanger les prélèvements de **3 animaux différents au maximum**.  
Le prélèvement doit être **conservé à 4°C** et **acheminé idéalement dans les 24h**. Il faut **éviter la conservation**.
- **Pour une recherche virologique**, le prélèvement doit être de **2 mL minimum** et acheminé sur **tube sec**. On peut mélanger le prélèvement de **5 animaux différents au maximum**.  
Si on souhaite une **recherche virologique par PCR**, il faut que le prélèvement ait passé **moins de 24h à température ambiante** ou **moins de 72h sous couvert du froid positif**. Au-delà de 72h d'attente, le prélèvement doit être **congelé**.  
Si on souhaite une **recherche virologique par culture**, le prélèvement doit passer **moins de 24h sous couvert du froid positif**. Au-delà de 24h d'attente, le prélèvement doit être **congelé**.

(LABOCEA, s. d.)

#### **BILAN : LAVAGE BRONCHO-ALVÉOLAIRE**

- Prélèvement de liquide pulmonaire par sondage trachéal
- Conditionnement et envoi au laboratoire différents en fonction du type de recherche étiologique demandée

### **2.1.4 Le prélèvement de poumon**

#### **2.1.4.1 Réalisation**

Lors d'une autopsie, le prélèvement de poumon **doit comporter un lobe présentant à la fois une zone lésée et une zone non lésée** (LABORATOIRE TERANA, s. d.).

#### **2.1.4.2 Conditionnement et envoi au laboratoire**

Le prélèvement doit être placé dans un **contenant fermé et hermétiquement étanche**.

Pour une **recherche bactériologique** : le prélèvement doit être conservé à **4°C pendant moins de 48h**. Au-delà de 48h, le prélèvement doit être **congelé**.

Pour une **recherche par culture virologique**, le prélèvement doit être **pendant 24h sous couvert du froid positif et congelé** au-delà. Pour une **virologie par PCR**, le prélèvement peut être conservé **pendant 24h à température ambiante, pendant 72h sous couvert du froid positif et congelé** au-delà de 72h. (LABOCEA, s. d.)

#### **BILAN : PRÉLÈVEMENT DE POUMON**

- Prélèvement d'un morceau de poumon comportant une zone lésée et une zone non lésée
- Conditionnement et envoi au laboratoire différents en fonction du type de recherche étiologique demandée

### 2.1.5 Bilan

Le bilan au sujet des prélèvements de l'appareil respiratoire est rassemblé dans le tableau 14 ci-dessous.

<b>Technique</b>	<b>Principe</b>	<b>Conditionnement et envoi au laboratoire</b>		
		<b>Bactériologie</b>	<b>Virologie</b>	
<b>Écouvillonnage Nasal Profond (ENP)</b>	Prélèvement de mucus et de sécrétions nasales grâce à un écouvillon	4°C et acheminé idéalement dans les 24h (éviter la congélation)	Milieu sec ou virocults	Culture : moins de 24h sous couvert du froid positif, congelé au-delà de 24h  PCR : moins de 24h à température ambiante, jusqu'à 72h sous couvert du froid positif, congelé au-delà de 72h
<b>Aspiration Trans-Trachéale (ATT)</b>	Prélèvement de liquide pulmonaire à partir de la mise en place d'un trocart dans la trachée et sa cathétérisation	0,5 mL minimum sur tube sec ou avec milieu de transport  4°C acheminé idéalement en 24h (éviter la congélation)	2 mL minimum sur tube sec	
<b>Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA)</b>	Prélèvement de liquide pulmonaire par sondage trachéal	0,5 mL minimum, sur tube sec ou avec milieu de transport  4°C acheminé idéalement en 24h	2 mL minimum, sur tube sec	
<b>Prélèvement de poumon</b>	Prélèvement d'un morceau de poumon comportant une zone lésée et une zone non lésée	4°C pendant moins de 48h  Au-delà de 48h : congeler		

Tableau 14 : Bilan des différents prélèvements de l'appareil respiratoire



## 2.2. Indications de ces prélèvements : dans quelles circonstances choisir quel prélèvement

Comme vu précédemment, certains prélèvements sont, d'après la littérature, à préconiser en fonction des agents pathogènes potentiellement mis en cause, comme résumé dans le tableau 15 ci-dessous :

Agent pathogène	Prélèvement conseillé	Délai à respecter entre début des signes cliniques et prélèvement
<b>BoHV1</b>	ENP ou Sérologie	Pic d'excrétion à 5 jours  10 jours
<b>PI3V</b>	ENP ou ATT	Jusqu'à 9 jours  Jusqu'à 12 jours
<b>BVDV</b>	Prise de sang	-
<b>VRSB</b>	ATT, LBA ou ENP	Premiers jours d'infection
<b>BCoV</b>	ENP, ATT, poumons	Premiers jours d'infection
<b>Pasteurelles</b>	ATT ou LBA	Dès les premiers jours d'infection
<b>Mycoplasmes</b>	ENP, poumons, ATT ou LBA	Dès les premiers jours d'infection

*Tableau 15 : Récapitulatif des prélèvements conseillés et des délais pour les réaliser pour les différents agents pathogènes respiratoires chez les bovins*

Il n'existe pas de consensus sur les circonstances dans lesquelles privilégier un type de prélèvement par rapport à un autre. Le choix du prélèvement se fait en fonction des différents avantages et inconvénients qu'ils représentent par rapport à différents critères (PARDON ET BUCZINSKI, 2020) comme résumé dans le tableau 16 ci-dessous :

	<b>Écouvillonnage nasal profond (ENP)</b>	<b>Aspiration Trans-Trachéale (ATT)</b>	<b>Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA)</b>	<b>Prélèvement de poumon</b>
<i>Lieu de prélèvement</i>	Muqueuse nasopharyngée	Bifurcation trachéale	Lobe pulmonaire individuel aléatoire	Lobe pulmonaire choisi
<i>Utilisation</i>	Usage unique, jetable	Usage unique, jetable ou réutilisable, stérilisable	Réutilisable, stérilisable	/
<i>Représentativité du bas appareil respiratoire</i>	+/-	Oui	Oui mais controversé	Oui
<i>Surface analysée</i>	< 0,5 cm <sup>2</sup>	5-10 cm <sup>2</sup>	> 10 cm <sup>2</sup>	> 10 cm <sup>2</sup>
<i>Coût</i>	-	++	+	-
<i>Temps estimé pour prélèvement de l'échantillon (min)</i>	< 1	10	1-10	5
<i>Risque de contamination par passage nasal</i>	Haut	Absent	Modéré (si utilisation d'une protection)	Absent
<i>Difficulté de la technique</i>	-	+	+	-
<i>Complications possibles</i>	- Hémorragie nasale - Cassure de la tige de l'écouvillon	- Emphysème sous-cutané - Infection de la plaie - Hémorragie locale - Perte accidentelle d'un bout de cathéter dans la trachée suite à une repousse de l'aiguille - Détresse respiratoire causée par les fluides injectés	- Hémorragie nasale - Hémorragie intrapulmonaire - Perforation des voies respiratoires - Détresse respiratoire causée par les fluides injectés	Aucune complication puisque prélèvement réalisé sur cadavre

Tableau 16 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de prélèvement respiratoire chez les bovins (modifié de (PARDON ET BUCZINSKI, 2020)).

Ainsi, en fonction des avantages et inconvénients connus par le praticien, celui-ci pourra choisir la méthode de prélèvement qui lui convient.

### **2.3. Problématiques de la pratique en milieu rural et de la réalisation, du conditionnement et de l'envoi de ces prélèvements**

Comme vu précédemment, lors de la réalisation de prélèvements respiratoires chez les bovins, des **précautions de conservation de ces prélèvements sont à prendre**. Pour la plupart des prélèvements destinés à la **recherche bactériologique**, les prélèvements doivent être **directement conservés à 4°C pendant 24h** et certains peuvent être **congelés au-delà** ; pour les prélèvements destinés à la **recherche virologique**, ils peuvent être **conservés à température ambiante pendant 24h si une PCR sera effectuée dessus**, sinon ils doivent directement être **placés sous couvert du froid pendant maximum 24h**.

Cependant, lors de la pratique vétérinaire en milieu rural, il est **rare que des praticiens disposent d'un outil réfrigérant dans leur voiture**, ce qui implique que les prélèvements nécessitant d'être directement conservés au réfrigérateur peuvent passer quelques heures dans la voiture du praticien, laquelle peut subir de **brutales variations de températures**.

Ainsi, il serait intéressant de **réfléchir sur une méthode de prélèvement ou de stockage des prélèvements permettant une conservation à température ambiante afin d'éviter de dénaturer le prélèvement ou de le rendre inexploitable**.

# Deuxième partie : Évaluation de l'effet du vieillissement des échantillons de type ENP et carte FTA® sur les performances des tests de détection de *Mannheimia haemolytica* et du Virus Respiratoire Syncytial Bovin par PCR.

---

## 1. Introduction

Depuis quelques années, un système basé sur l'utilisation d'un **papier filtre** pour la collection et le transport d'échantillons **permettant le diagnostic d'agents infectieux** a émergé. Ce sont des cartes dites **cartes FTA®** qui ont été traitées de façon à **inactiver par contact le virus ou la bactérie** qui y est déposé. De plus, cette carte se **conserve à température ambiante**. Elle permet alors un **transport sécurisé et facilité** du matériel prélevé jusqu'au laboratoire pour les prélèvements destinés à la **détection par PCR du matériel génétique des agents pathogènes** (SARANGI L.N., THODANGALA N., RANA S.K., *et al.*, 2018).

Ces cartes sont constituées d'un **papier filtre spécial** imprégné d'une **solution permettant une lyse des cellules et une dénaturation des protéines** qui y sont déposées avec une captation des acides nucléiques qui étaient présents dans la matrice de la carte (DA CUNHA SANTOS, 2018).

Ainsi, étant données les problématiques des conditions de travail d'un vétérinaire rural concernant la conservation des prélèvements respiratoires chez les bovins, certains praticiens ont été incités à **utiliser ces cartes FTA® pour l'envoi de prélèvements respiratoires**.

En plus d'être pratiques pour la **conservation** et l'**envoi de prélèvements respiratoires** chez les **bovins**, ces cartes FTA pourraient permettre une **conservation plus longue** du matériel génétique que les ENP. Nous avons voulu, dans cette étude expérimentale, déterminer **comment évolue la conservation du matériel génétique exploitable par PCR dans le temps** en comparant la recherche de présence de matériel génétique de *Mannheimia haemolytica* et de **Virus Respiratoire Syncytial Bovin sur des ENP et sur des cartes FTA®**.

Le principe de l'expérience qui a été menée a été de réaliser deux **suspensions de Mh et de VRS de concentrations connues** et avec un **Ct (cycle de seuil) aux environs de 30-32** et de réaliser des **écouvillons** à partir de cette suspension. Certains de ces écouvillons ont été **stockés à -20°C durant 7 ou 14 jours** et d'autres écouvillons ont permis de réaliser des cartes FTA qui ont été **stockées à température ambiante durant 7 ou 14 jours**. Ainsi, nous avons pu déterminer l'évolution de la détection de Mh et de VRS dans le temps à **J0, J7 et J14 sur des ENP et des cartes FTA®**.

## 2. Matériels et méthodes

Lors de cette étude expérimentale, nous avons cherché à **démontrer les effets du vieillissement des échantillons dopés (c'est-à-dire imprégnés) par deux suspensions de Mh et de VRS sur des ENP conservés à -20°C et sur des cartes FTA® conservées à température ambiante (20°C)** concernant la détection de matériel génétique de Mh et de VRS par PCR.

Pour cela, nous avons tout d'abord réalisé une **suspension de Mh et de VRS** avec des **concentrations connues**. Nous avons calibré cette solution afin de déterminer à quelles dilutions nous allons l'utiliser dans l'étude expérimentale grâce à une **épreuve de calibrage**.

Après avoir déterminé les dilutions auxquelles nous allons utiliser la solution de Mh et de VRS, nous avons réalisé les **prélèvements** (écouvillons et cartes FTA) qui **allaient être analysés à J0, J7 et J14**.

Ensuite, nous avons, à **J0, J7 et J14, analysé les échantillons par méthode PCR**.

Enfin, nous avons effectué **3 séances identiques** afin de déterminer si nos résultats étaient reproductibles ou non.

### 2.1 Calibrage de la solution de Mh et VRS utilisée pour l'expérience

Tout d'abord, nous avons réalisé une **suspension de Mh et de VRS à des concentrations connues** pour avoir un **Ct aux environs de 30/32** afin d'être proche d'au moins 10 fois la limite de détection de la méthode ce qui nous permet de mimer un prélèvement biologique comportant assez peu d'agent pathogène tout en restant détectable.

Nous disposions d'une solution de Mh (titre de  $10^7$  UFC/mL) réalisée par le service de bactériologie de LABOCEA qui avait déjà été utilisée auparavant pour le même type d'étude. Nous avons utilisé une solution de VRS (titre de  $10^{3,8}$  DCP50/mL) produite par le service de virologie de LABOCEA.

Nous avons mélangé ces deux solutions à des concentrations connues, puis nous avons réalisé **une série de PCR** afin de **déterminer le Ct de cette solution pour MH et VRS sur la solution pure**, la solution **diluée à  $10^{-1}$** , un écouvillon de la solution diluée à  $10^{-1}$ , une **carte FTA® de la solution diluée à  $10^{-1}$**  et sur la **solution diluée à  $10^{-2}$** . (L'écouvillon et la carte FTA® ont été réalisés de la même manière que les écouvillons et les cartes FTA® pour l'expérience, méthode décrite dans la partie ci-après « 2.2 Réalisation des échantillons » et les échantillons ont été préparés de la même manière que pour l'expérience, méthode décrite dans la partie « 2.3 Analyse à J0, J7 et J14 des échantillons »).

Grâce à ce calibrage, nous avons déterminé que **la solution mère et la solution diluée au dixième allaient être les solutions utilisées tout au long de l'expérience**.

### 2.2. Réalisation des échantillons

Pour chaque séance d'analyse, les échantillons dont nous avons eu besoin ont été de **12 écouvillons** dont **la moitié auront été dopés avec la solution mère et l'autre moitié avec la solution diluée au dixième**. 3 écouvillons dopés avec la solution mère et 3 écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième ont été **conservés à -20°C** et **un écouvillon de chaque solution a été analysé à J0, J7 et J14**. Les autres écouvillons restants ont **directement servi à l'élaboration de cartes FTA® conservées à +20°C** dont **une de chaque solution a été analysée à J0, J7 et J14**.

Ainsi, une **notation** a été pensée pour pouvoir mieux s'y retrouver : chaque échantillon sera nommé **JX-ECY** ou **JX-FTAY** avec **X** pouvant être **0, 7 ou 14** en fonction du **jour où l'échantillon sera analysé** et **Y** pouvant être **1** s'il s'agit d'un échantillon dopé avec la solution mère ou **2** s'il s'agit d'un échantillon dopé avec la solution diluée au dixième.

Le tableau X ci-dessous résume les échantillons réalisés à chaque séance et quand ils ont été analysés :

	Écouvillons		Cartes FTA®	
	Dopés avec la solution mère	Dopés avec la solution diluée au dixième	Dopées avec la solution mère	Dopées avec la solution diluée au dixième
<b>Échantillons analysés à J0</b>	J0-EC1	J0-EC2	J0-FTA1	J0-FTA2
<b>Échantillons analysés à J7</b>	J7-EC1	J7-EC2	J7-FTA1	J7-FTA2
<b>Échantillons analysés à J14</b>	J14-EC1	J14-EC2	J14-FTA1	J14-FTA2

*Tableau 17 : Résumé des différents échantillons réalisés pour chaque séance et à quels moments ils sont analysés*

### 2.2.1. Réalisation des écouvillons

Les 12 écouvillons ont été réalisés de la manière qui suit :

→ Pour les 6 écouvillons réalisés avec la solution mère :

- 1mL de la solution mère de Mh/VRS a été placé à l'aide d'une pipette dans le tube de chaque écouvillon
- Chaque tube a été vortexé pendant 1minute minimum
- Chaque écouvillon a été séché dans son tube à température ambiante pendant 1 à 2h

Dans ces 6 écouvillons, 3 ont été choisis aléatoirement et nommés :

- J0-EC1
- J7-EC1
- J14-EC1

Ces écouvillons seront les écouvillons analysés directement à J0, J7 et J14. Ils sont conservés à -20°C. Les 3 restants ont ensuite été utilisés pour réaliser les cartes FTA® selon la méthode en partie 2.2.2.

→ Pour les 6 écouvillons réalisés avec la solution diluée au dixième :

- 1mL de la solution diluée au dixième de Mh/VRS a été placé à l'aide d'une pipette dans le tube de chaque écouvillon
- Chaque tube a été vortexé pendant 1minute minimum
- Chaque écouvillon a été séché dans son tube à température ambiante pendant 1 à 2h

Dans ces 6 écouvillons, 3 ont été choisis aléatoirement et nommés :

- J0-EC2
- J7-EC2
- J14-EC2

Ces écouvillons seront les écouvillons analysés directement à J0, J7 et J14. Ils sont conservés à -20°C. Les 3 restants ont ensuite été utilisés pour réaliser les cartes FTA® selon la méthode en partie 2.2.2.

### **2.2.2. Réalisation des cartes FTA®**

Les 6 cartes FTA® ont été réalisées de la manière qui suit :

→ Pour les 3 cartes FTA® réalisées avec les écouvillons dopés avec la solution mère :

- Réhumidification des écouvillons dopés avec la solution mère avec 2 gouttes de PBS (Phosphate buffered saline)
- Chaque écouvillon a été frotté de manière excentrique en le roulant dans le cercle de la carte FTA® puis on a attendu qu'elle sèche

Ces 3 cartes ont été nommées :

- J0-FTA1
- J7-FTA1
- J14-FTA1

→ Pour les 3 cartes FTA® réalisées avec les écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième :

- Réhumidification des écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième avec 2 gouttes de PBS (Phosphate buffered saline)
- Chaque écouvillon a été frotté de manière excentrique en le roulant dans le cercle de la carte FTA® puis on a attendu qu'elle sèche

Ces 3 cartes ont été nommées :

- J0-FTA2
- J7-FTA2
- J14-FTA2

Ces cartes FTA® seront les cartes analysées à J0, J7 et J14. Elles sont conservées à +20°C.

### 2.2.3. Remarques sur la réalisation des cartes FTA®

La méthode utilisée pour réaliser ces cartes FTA® a été pensée **de façon à être la plus proche des conditions réelles d'élaboration d'échantillons sur le terrain.**

En effet, sur le terrain, les vétérinaires effectuent leur **prélèvement avec un écouvillon, puis, une fois arrivés à la clinique, ils ré-humidifient l'écouvillon et le frottent à la carte FTA® (ZOETIS, ENVA, 2019).**

### 2.3. Analyse à J0, J7 et J14 des échantillons

À J0, les écouvillons analysés seront les écouvillons J0-EC1 et J0-EC2 et les cartes analysées seront les cartes J0-FTA1 et J0-FTA2.

À J7, les écouvillons analysés seront les écouvillons J7-EC1 et J7-EC2 et les cartes analysées seront les cartes J7-FTA1 et J7-FTA2.

À J14, les écouvillons analysés seront les écouvillons J14-EC1 et J14-EC2 et les cartes analysées seront les cartes J14-FTA1 et J14-FTA2.

#### 2.3.1. Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés **comme des échantillons « lambda » reçus en routine au laboratoire.** En effet, les échantillons sont souvent placés à  $-20^{\circ}\text{C}$  lors de leur arrivée au laboratoire afin d'attendre d'avoir une série de prélèvements à analyser.

##### ❖ Préparation des écouvillons

Les écouvillons sont **décongelés à  $4^{\circ}\text{C}$** , puis **2mL de PBS (Tampon Phosphate Salin) sont instillés dans les tubes** des écouvillons qui seront ensuite **vortexés pendant 1 minute minimum.** Le liquide récupéré (éluat) dans le tube de l'écouvillon sera prélevé pour la PCR comme schématisé sur la figure 10 ci-dessous.

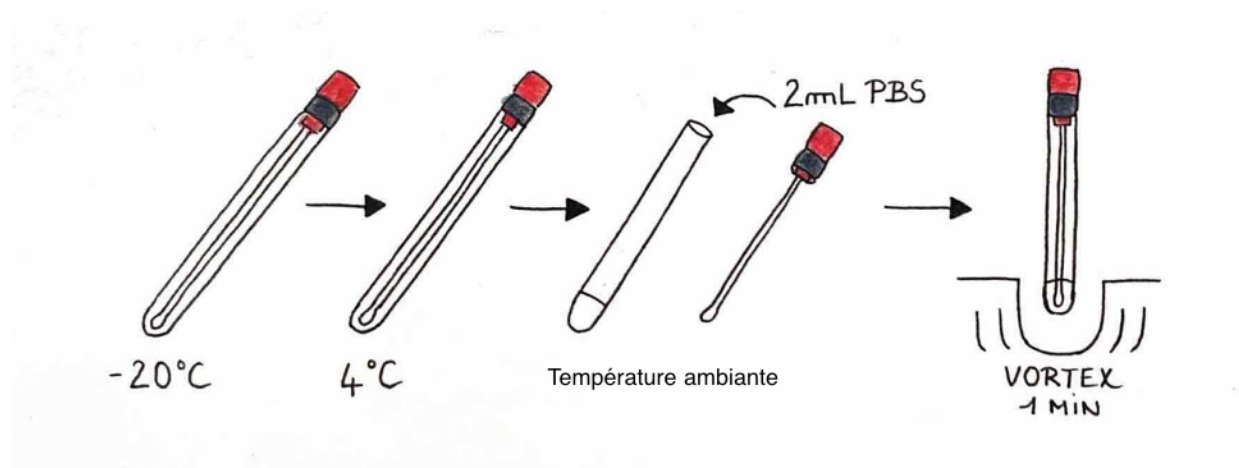


Figure 10 : Schéma de la préparation des écouvillons (Dessin personnel)



### ❖ Préparation des cartes FTA®

**10 poinçons de 3mm** sont réalisés à l'aide de **punch à biopsie** avec pour support une boîte de Pétri. Ils sont ajoutés dans un **tube Eppendorf de 2,5mL** comme schématisé sur la figure 11 ci-après. Les punch et les boîtes de pétri sont à usage unique (1 par échantillon à traiter).

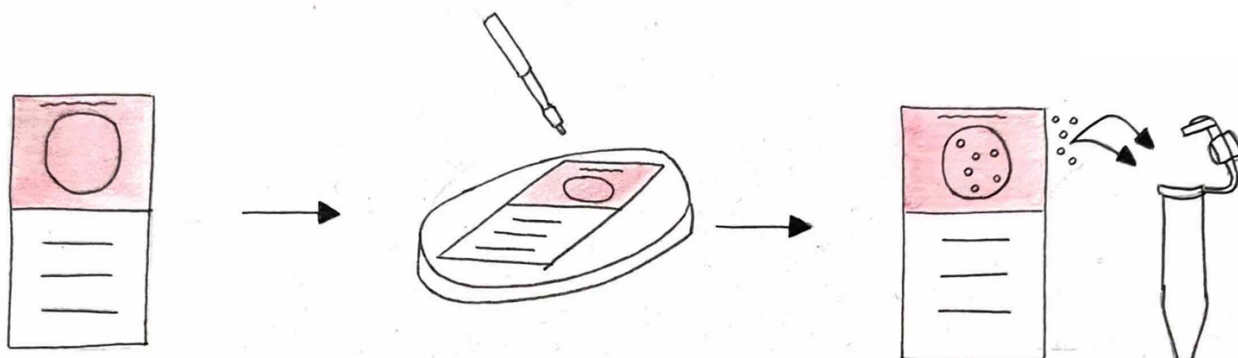


Figure 11 : Schéma de la préparation des cartes FTA® (Dessin personnel)

### 2.3.2. Lyse des échantillons

#### ❖ Lyse de l'éluat des écouvillons

L'éluat des écouvillons est **centrifugé à 1500g pendant 10min +/- 1min**, le **surnageant est éliminé par retournement** en prenant soin de garder un peu de liquide (environ 100 $\mu$ L) au dessus du culot cellulaire.

**180 $\mu$ L de tampon de lyse LYS1 et 25 $\mu$ L de protéinase K Machery-Nagel sont ajoutés**, puis les tubes sont **vortexés et incubés pendant 30min +/- 5min à 70°C +/- 1°C**.

Les tubes sont **refroidis et centrifugés brièvement (pulse)** avant ouverture. À cette étape, les échantillons peuvent être conservés à 4°C dans la limite de 4h.

**Tout le lysat de l'échantillon est déposé dans une plaque Deep-well.**

Toutes ces étapes sont schématisées sur la figure 12 ci-dessous.

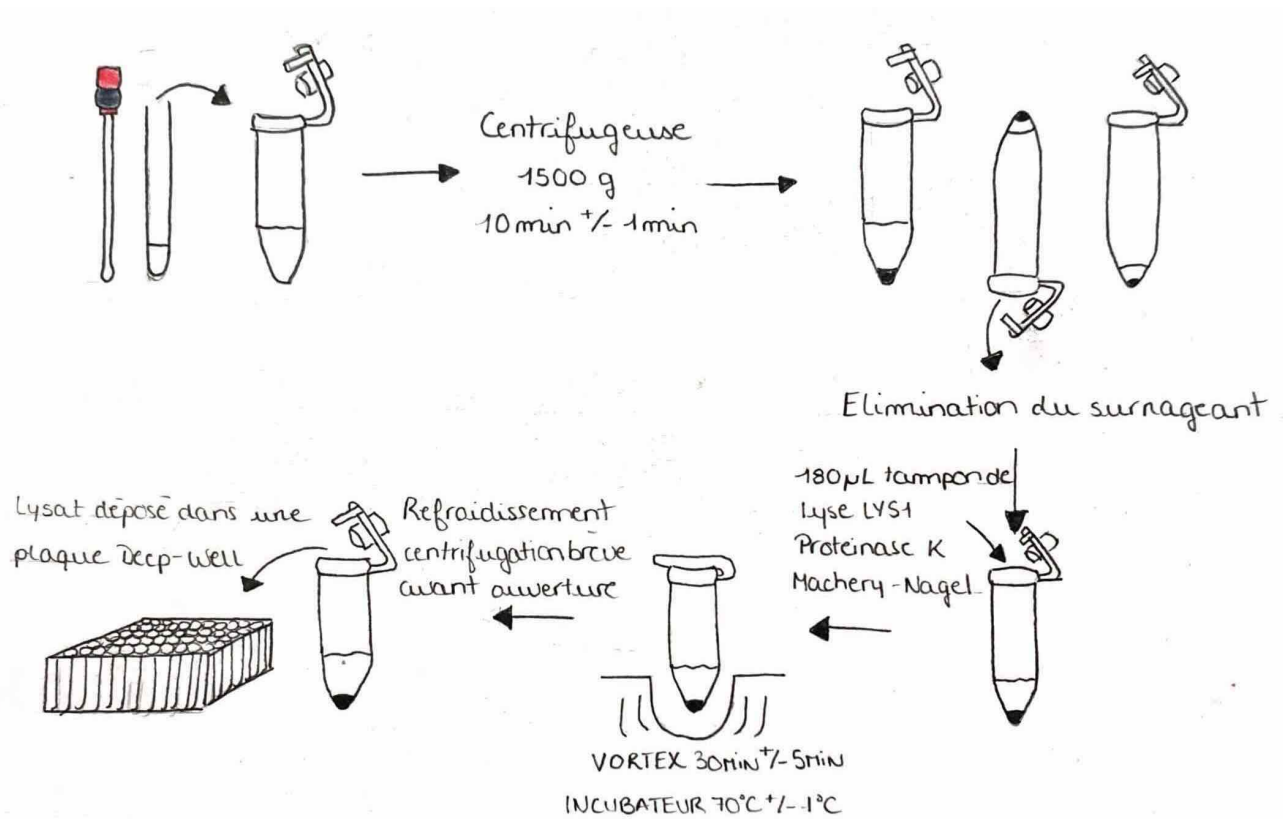


Figure 12 : Schéma des étapes de lyse de l'éluat des écouvillons (Dessin personnel)

#### ❖ Lyse des cartes FTA®

**250 µL de solution RNA Rapid Extraction sont ajoutés aux tubes Ependorf contenant les pastilles de carte FTA®.** Les tubes sont incubés 5 à 10min à 21°C +/- 5°C sous agitation lente (500rpm). Puis ils sont centrifugés brièvement (pulse) avant ouverture.

**250 µL de tampon de lyse LYS1 est placé dans chaque puits de la plaque Deep-well** allant recevoir les lysats, puis la **totalité du lysat est déposé dans chaque puits.**

Toutes ces étapes sont schématisées sur la figure 13 ci-dessous.

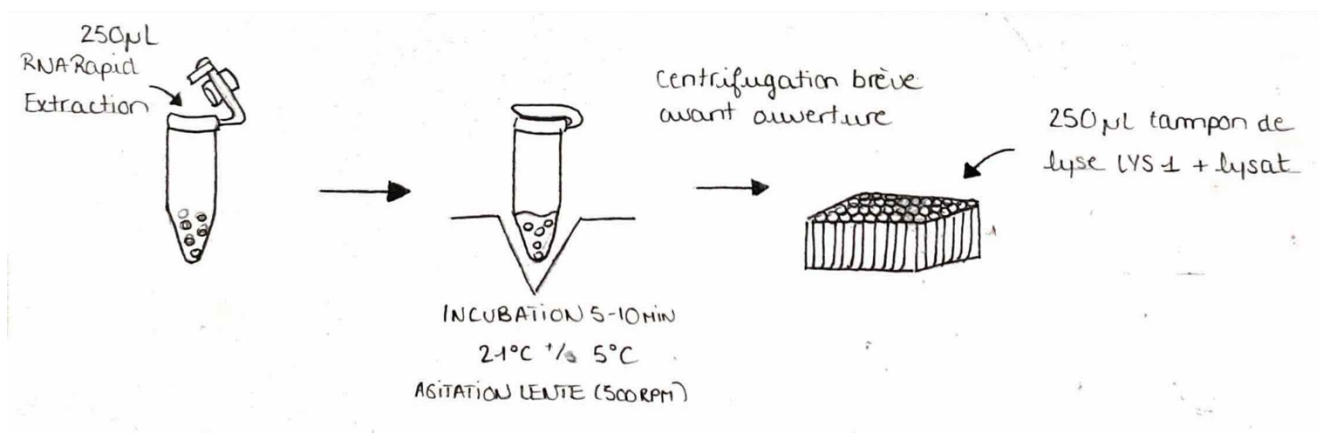


Figure 13 : Schéma des étapes de lyse des cartes FTA® (Dessin personnel)

### 2.3.3. Fixation, purification et élution des acides nucléiques (fait par un automate)

Voici après ces étapes, le plan de la plaque de lyse Deep-well schématisé sur la figure 14 ci-dessous :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0								
B	JX-EC1								
C	JX-EC2								
D	JX-FTA1								
E	JX-FTA2								
F									
G									
H									
I									

Figure 14 : Plan de la plaque de lyse Deep-well (les cases vides sont utilisées pour les échantillons de routine reçus par le laboratoire)

0 en A1 correspond à un **témoin négatif** constitué de **100µL de PBS**. Le X de « JX » étant à adapter en fonction du jour d'analyse J0, J7 ou J14.

Dans toutes les cases vides, **d'autres échantillons de routine pourront être placés**, les analyses des échantillons de cette expérience étant faites en même temps que les analyses des échantillons de routine reçus par le laboratoire.

Dans **3 nouvelles plaques Deep-well**, il faudra placer les **tampons de lavage correspondants** :

- Tampon de lavage 1 WASH 1 : 600µL/puits
- Tampon de lavage 2 WASH 2 : 600µL/puits
- Tampon de lavage 3 WASH 3 (=EtOH 80%) : 600µL/puits

Puis dans une **microplaque pour élution**, placer le **tampon ELU**.

Sur la plaque Deep-well de Lyse, ajouter **620µL/puits de solution MAGBEADS-BB** dans chaque puits contenant un échantillon, en veillant à **bien homogénéiser régulièrement la solution de billes** dans le réservoir tout au long de la distribution.

**L'automate d'extraction** est alors chargé avec la plaque Deep-well de Lyse contenant les échantillons, **les 3 plaques Deep-well contenant les tampons de lavage** et la **microplaque d'élution**, puis le **programme d'extraction est lancé**.

À la fin du programme, la **plaque d'extraits est récupérée** et visuellement contrôlée puis **protégée et conservée à 5°C +/-3°C pour une amplification dans les 4h ou à -16°C pour une amplification au-delà.**

### 2.3.4. Préparation des réactifs de la PCR

Les **kits d'amplification (mix)** sont mis à **décongeler à 5°C +/-3°C** ou à **température ambiante** s'ils sont utilisés dès que la décongélation est complète. Les **tubes de mix sont homogénéisés par agitation douce et centrifugés brièvement (pulse) avant utilisation.**

Sur une plaque PCR, il faut placer **20µL/puits de mix** correspondant à la ligne, puis ajouter **5µL/puits d'extrait.**

Les échantillons de notre expérience ont été analysés sur des plaque PCR contenant 5 échantillons de routine selon le plan schématisé dans la figure 15 :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	EPC(HS)	NCS(HS)	Échantillons de routine										
B	EPC(MH)	NCS(MH)						0	JX-EC1	JX-EC2	JX-FTA1	JX-FTA2	
C	EPC(PM)	NCS(PM)											
D	EPC(MB)	NCS(MB)											
E	EPC(CoV)	NCS(CoV)											
F	EPC(Pi3)	NCS(Pi3)											
G	EPC(VRS)	NCS(VRS)						0	JX-EC1	JX-EC2	JX-FTA1	JX-FTA2	
H										Ti			

Figure 15 : Plan d'une plaque PCR

Cases oranges : Mix MH, Cases vertes : Mix VRS

EPC : External Positive Control; NCS : Témoin négatif

Ti : sentinelle produite par le laboratoire, attendue positive pour une valence et proche de 10 fois la Limite de Détection Méthode.

### 2.3.5. Programme d'amplification

Différents **détecteurs** sont créés sur le thermocycleur comme résumé sur le tableau 17 ci-après :

	Reporter	Quencher
MB, HS, PM, MH, BCOV, RSV, BPI3	FAM™ (6-carboxyfluorescéine)	NFQ (Non-Fluorescent Quencher)
IPC (Internal Positive Control) SRPR	VIC™ (Victoria™)	NFQ

Tableau 18 : Détecteurs créés sur le thermocycleur

Le FAM™ et le VIC™ sont des fluorophores ayant leurs maximums d'émission à respectivement 515nm et 554nm.

Le programme de RT-PCR suivant est ensuite créé :

	Répétitions de l'étape	Température	Durée
Étape 1	X1	45°C	10min
Étape 2	X1	95°C	10min
Étape 3	X45	95°C	15sec
		60°C	1min

Tableau 19 : Programme de RT-PCR

### 3. Résultats

#### 3.1 Résultats du calibrage des suspensions de Mh et VRS

Notre objectif était de **réaliser des suspensions de Mh et de VRS de concentration connue afin d'obtenir à la PCR des échantillons (ENP et carte FTA®) un Ct aux environs de 30/32.**

Les résultats du calibrage des suspensions de Mh et VRS sont résumés dans le tableau 19 ci-dessous.

	Ct Mh	Ct VRS
1 – Suspension Mh/VRS pure	20,93	22,65
2 – Suspension Mh/VRS 1/10 <sup>e</sup>	22,89	26,46
3- Écouvillon dopé avec échantillon n° 2 (1/10 <sup>e</sup> )	27,28	32,96
4- Carte FTA dopée avec échantillon n° 2 (1/10 <sup>e</sup> )	30,33	34,96
5- Suspension Mh/VRS 1/100 <sup>e</sup>	26,21	30,81

Tableau 20 : Résultats du calibrage des suspensions de Mh et VRS

On constate que **l'écouvillon et la carte FTA® dopés avec la suspension Mh/VRS diluée au dixième ont à la PCR des Ct aux alentours des valeurs espérées.** Nous avons alors validé le calibrage de la suspension Mh/VRS en choisissant **la solution pure et la suspension diluée au dixième.**

### 3.2 Résultats bruts de l'étude de l'impact du vieillissement sur la qualité et la précision des échantillons en comparant des écouillons avec des cartes FTA®

L'étude décrite ci-dessus a donné les résultats suivants, rassemblés dans le tableau 20 :

	Séance 1		Séance 2		Séance 3	
	Ct Mh	Ct VRS	Ct Mh	Ct VRS	Ct Mh	Ct VRS
<b>J0-EC1</b>	28,31	28,13	30,50	29,75	28,59	28,82
<b>J0-EC2</b>	31,98	31,82	35,64	33,17	31,51	32,22
<b>J0-FTA1</b>	29,64	30,00	28,80	31,24	29,11	31,09
<b>J0-FTA2</b>	33,59	33,92	32,73	35,75	32,62	35,91
<b>J7-EC1</b>	28,90	28,90	29,83	29,92	29,34	29,05
<b>J7-EC2</b>	31,50	33,05	33,29	33,05	33,20	32,73
<b>J7-FTA1</b>	30,18	31,39	29,23	31,76	28,92	31,57
<b>J7-FTA2</b>	32,76	34,11	32,89	35,21	32,04	34,40
<b>J14-EC1</b>	29,81	28,96	31,24	30,69	25,30	30,04
<b>J14-EC2</b>	33,16	33,04	34,88	33,79	30,25	34,01
<b>J14-FTA1</b>	30,27	31,77	29,58	33,60	29,04	31,87
<b>J14-FTA2</b>	33,77	35,87	33,09	36,60	31,77	35,09

Tableau 21 : Résultats bruts des 3 séances d'analyses

### 3.3 Étude de la stabilité de l'échantillon dans le temps

Pour étudier la **stabilité des échantillons dans le temps**, nous avons tout d'abord voulu effectuer un **test de comparaison de moyennes**. Le test de Student ne pouvant pas être utilisé car nous ne pouvons pas vérifier la normalité de la répartition des valeurs, le nombre d'échantillons étant trop faible, nous avons alors utilisé le **test de Wilcoxon**, dont toutes les conditions sont respectées.

#### 3.3.1. Stabilité des écouillons avec Mh

##### 3.3.1.1 Stabilité pour Mh des écouillons dopés avec la solution pure

Nous avons comparé les écouillons dopés avec la solution pure pour Mh entre J0, J7 et J14. Pour rappel, les valeurs brutes obtenues sont récapitulées dans le tableau 21 ci-dessous.

	Valeurs brutes			Moyennes	Écart types
	Séance 1	Séance 2	Séance 3		
<b>J0-EC1</b>	28,31	30,5	28,59	29,13	1,19
<b>J7-EC1</b>	28,9	29,83	29,34	29,36	0,46
<b>J14-EC1</b>	29,81	31,24	25,3	28,78	3,10

Tableau 22 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écarts types pour étudier la stabilité des écouillons dopés avec la solution pure pour Mh

Pour comparer les valeurs entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14, un test de Wilcoxon a été réalisé et les valeurs obtenues sont récapitulées dans le tableau 22 ci-dessous :

	<b>p</b>	<b>Conclusion</b>
<b>Entre J0 et J7</b>	0,7	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>Entre J7 et J14</b>	1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>Entre J0 et J14</b>	1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes

*Tableau 23 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution pure pour Mh entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes*

Pour les **écouvillons dopés avec la solution pure, pour Mh**, que ce soit **entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14**, on constate que **les moyennes des échantillons ne sont pas significativement différentes**.

### 3.3.1.2 Stabilité pour Mh des écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième

Nous avons comparé les écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième pour Mh entre J0, J7 et J14. Pour rappel, les valeurs brutes obtenues sont récapitulées dans le tableau 23 ci-dessous.

	<b>Valeurs brutes</b>			<b>Moyennes</b>	<b>Écart types</b>
	Séance 1	Séance 2	Séance 3		
<b>J0-EC2</b>	31,98	35,64	31,51	33,04	2,26
<b>J7-EC2</b>	31,5	33,29	33,2	32,66	1,01
<b>J14-EC2</b>	33,16	34,88	30,25	32,76	2,34

*Tableau 24 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écarts types pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième pour Mh*

Pour comparer les valeurs entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14, un test de Wilcoxon a été réalisé et les valeurs obtenues sont récapitulées dans le tableau 24 ci-dessous :

	<b>p</b>	<b>Conclusion</b>
<b>Entre J0 et J7</b>	1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>Entre J7 et J14</b>	1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>Entre J0 et J14</b>	1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes

*Tableau 25 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième pour Mh entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes*

Pour les **écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième, pour Mh**, que ce soit **entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14**, on constate que **les moyennes des échantillons ne sont pas significativement différentes**.

### 3.3.2. Stabilité des cartes FTA® avec Mh

#### 3.3.2.1 Stabilité pour Mh des cartes FTA® dopées avec la solution pure

Nous avons comparé les cartes FTA® dopées avec la solution pure, pour Mh entre J0, J7 et J14. Pour rappel, les valeurs brutes obtenues sont récapitulées dans le tableau 25 ci-dessous.

	<b>Valeurs brutes</b>			<b>Moyennes</b>	<b>Écart types</b>
	Séance 1	Séance 2	Séance 3		
<b>J0-FTA1</b>	29,64	28,8	29,11	29,18	0,42
<b>J7-FTA1</b>	30,18	29,23	28,92	29,44	0,66
<b>J14-FTA1</b>	30,27	29,58	29,04	29,63	0,62

*Tableau 26 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écart types pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution pure pour Mh*

Pour comparer les valeurs entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14, un test de Wilcoxon a été réalisé et les valeurs obtenues sont récapitulées dans le tableau 26 ci-dessous :



	<b>p</b>	<b>Conclusion</b>
<b>Entre J0 et J7</b>	0,7	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>Entre J7 et J14</b>	0,7	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>Entre J0 et J14</b>	0,7	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes

*Tableau 27 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution pure pour Mh entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes*

Pour les **cartes FTA® dopées avec la solution pure, pour Mh**, que ce soit **entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14**, on constate que **les moyennes des échantillons ne sont pas significativement différentes**.

### 3.3.2.2 Stabilité pour Mh des cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième

Nous avons comparé les cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième, pour Mh entre J0, J7 et J14. Pour rappel, les valeurs brutes obtenues sont récapitulées dans le tableau 27 ci-dessous.

	<b>Valeurs brutes</b>			<b>Moyennes</b>	<b>Écart types</b>
	Séance 1	Séance 2	Séance 3		
<b>J0-FTA2</b>	33,59	32,73	32,62	32,98	0,53
<b>J7-FTA2</b>	32,76	32,89	32,04	32,56	0,46
<b>J14-FTA2</b>	33,77	33,09	31,77	32,88	1,02

*Tableau 28 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écart types pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième pour Mh*

Pour comparer les valeurs entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14, un test de Wilcoxon a été réalisé et les valeurs obtenues sont récapitulées dans le tableau 28 ci-dessous :

	<b>p</b>	<b>Conclusion</b>
<b>Entre J0 et J7</b>	1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>Entre J7 et J14</b>	0,7	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>Entre J0 et J14</b>	1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes

*Tableau 29 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième pour Mh entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes*

Pour les **cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième, pour Mh**, que ce soit **entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14**, on constate que **les moyennes des échantillons ne sont pas significativement différentes**.

### 3.3.3. Stabilité des écouvillons avec le VRS

#### 3.3.3.1 Stabilité pour VRS des écouvillons dopés avec la solution pure

Nous avons comparé les écouvillons dopés avec la solution pure pour le VRS entre J0, J7 et J14. Pour rappel, les valeurs brutes obtenues sont récapitulées dans le tableau 29 ci-dessous.

	<b>Valeurs brutes</b>			<b>Moyennes</b>	<b>Écarts types</b>
	Séance 1	Séance 2	Séance 3		
<b>J0-EC1</b>	28,13	29,75	28,82	28,9	0,81
<b>J7-EC1</b>	28,9	29,92	29,05	29,29	0,55
<b>J14-EC1</b>	28,96	30,69	30,04	29,90	0,87

*Tableau 30 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écarts types avec test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution pure pour le VRS*

Pour comparer les valeurs entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14, un test de Wilcoxon a été réalisé et les valeurs obtenues sont récapitulées dans le tableau 30 ci-dessous :

	<b>p</b>	<b>Conclusion</b>
<b>Entre J0 et J7</b>	0,4	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>Entre J7 et J14</b>	0,4	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>Entre J0 et J14</b>	0,2	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes

*Tableau 31 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution pure pour VRS entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes*

Pour les écouvillons dopés avec la solution pure, pour le VRS, que ce soit entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14, on constate que les moyennes des échantillons ne sont pas significativement différentes.

### 3.3.3.2 Stabilité pour le VRS des écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième

Nous avons comparé les écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième pour le VRS entre J0, J7 et J14. Pour rappel, les valeurs brutes obtenues sont récapitulées dans le tableau 31 ci-dessous.

	<b>Valeurs brutes</b>			<b>Moyennes</b>	<b>Écart types</b>
	Séance 1	Séance 2	Séance 3		
<b>J0-EC2</b>	31,82	33,17	32,22	32,44	0,68
<b>J7-EC2</b>	33,05	33,05	32,73	32,94	0,18
<b>J14-EC2</b>	33,04	33,79	34,01	33,61	0,51

*Tableau 32 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écarts types avec test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième pour le VRS*

Pour comparer les valeurs entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14, un test de Wilcoxon a été réalisé et les valeurs obtenues sont récapitulées dans le tableau 32 ci-dessous :

	p	Conclusion
Entre J0 et J7	0,6579	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
Entre J7 et J14	0,3758	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
Entre J0 et J14	0,2	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes

*Tableau 33 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième pour VRS entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes*

Pour les écouvillons dopés avec la solution diluée au dixième, pour le VRS, que ce soit entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14, on constate que les moyennes des échantillons ne sont pas significativement différentes.

### 3.3.4. Stabilité des cartes FTA® avec le VRS

#### 3.3.4.1 Stabilité pour le VRS des cartes FTA® dopées avec la solution pure

Nous avons comparé les cartes FTA® dopées avec la solution pure, pour le VRS entre J0, J7 et J14. Pour rappel, les valeurs brutes obtenues sont récapitulées dans le tableau 33 ci-dessous.

	Valeurs brutes			Moyennes	Écart types
	Séance 1	Séance 2	Séance 3		
<b>J0-FTA1</b>	30	31,24	31,09	30,78	0,98
<b>J7-FTA1</b>	31,39	31,76	31,57	31,57	0,19
<b>J14-FTA1</b>	31,77	33,6	31,87	32,41	1,03

*Tableau 34 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écarts types pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution pure pour le VRS*

Pour comparer les valeurs entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14, un test de Wilcoxon a été réalisé et les valeurs obtenues sont récapitulées dans le tableau 34 ci-dessous :

	p	Conclusion
<b>Entre J0 et J7</b>	0,1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes
<b>Entre J7 et J14</b>	0,1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes
<b>Entre J0 et J14</b>	0,1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes

*Tableau 35 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution pure pour VRS entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des valeurs différentes*

Pour les **cartes FTA® dopées avec la solution pure, pour le VRS**, que ce soit **entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14**, on constate que **les moyennes des échantillons ne sont pas significativement différentes, mais le p est à chaque fois inférieur ou égal à 0,1, donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes : le Ct des cartes FTA® dopées avec la solution pure pour la recherche de VRS a tendance à être plus grand avec le temps.**

#### 3.3.4.2 Stabilité pour le VRS des cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième

Nous avons comparé les cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième, pour VRS entre J0, J7 et J14. Pour rappel, les valeurs brutes obtenues sont récapitulées dans le tableau 35 ci-dessous.

	Valeurs brutes			Moyennes	Écart types
	Séance 1	Séance 2	Séance 3		
<b>J0-FTA2</b>	33,92	35,75	35,91	35,19	1,11
<b>J7-FTA2</b>	34,11	35,21	34,4	34,57	0,57
<b>J14-FTA2</b>	35,87	36,6	35,09	35,85	0,76

*Tableau 36 : Rappel des valeurs brutes à comparer et calcul des moyennes et écart types pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième pour le VRS*

Pour comparer les valeurs entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14, un test de Wilcoxon a été réalisé et les valeurs obtenues sont récapitulées dans le tableau 36 ci-dessous :

	<b>p</b>	<b>Conclusion</b>
<b>Entre J0 et J7</b>	0,7	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>Entre J7 et J14</b>	0,2	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>Entre J0 et J14</b>	0,7	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes

*Tableau 37 : Test de Wilcoxon pour étudier la stabilité des cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième pour le VRS entre J0 et J7, J7 et J14, J0 et J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes*

Pour les **cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième, pour le VRS**, que ce soit **entre J0 et J7, entre J7 et J14 et entre J0 et J14**, on constate que **les moyennes des échantillons ne sont pas significativement différentes**.

### 3.3.5. Conclusion

On constate que, pour **les échantillons avec Mh et le VRS**, que ce soit **sur les écouvillons ou les cartes FTA® dopés avec la solution pure ou la solution diluée au dixième, les concentrations mesurées n'évoluent pas significativement avec le temps**. Seule une tendance est observée pour la mesure de VRS des cartes FTA® dopées avec la solution pure : le Ct a tendance à augmenter avec le temps.

## 3.4 Comparaison entre l'utilisation des écouvillons ou des cartes FTA®

### 3.4.1. Échantillons avec Mh

#### 3.4.1.1. Échantillons avec Mh à J0

##### 3.4.1.1.1 Échantillons avec Mh à J0 dopés avec la solution pure

Nous avons comparé les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure pour Mh à J0. Pour rappel, les valeurs brutes sont récapitulées dans le tableau 29 ci-dessous. Les valeurs des écouvillons et des cartes FTA® ont été comparées grâce à un test de Wilcoxon dont la valeur obtenue a été indiquée dans le tableau 37 ci-dessous :

	<b>Valeurs brutes</b>			<b>Moyennes</b>	<b>Écarts types</b>	<b>p</b>	<b>Conclusion</b>
	Séance 1	Séance 2	Séance 3				
<b>J0-EC1</b>	28,31	30,5	28,59	29,13	1,19	0,7	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>J0-FTA1</b>	29,64	28,8	29,11	29,18	0,42		

*Tableau 38 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour Mh, à J0 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes*

On constate que **les valeurs de Ct entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour Mh, ne sont pas significativement différentes à J0.**

#### 3.4.1.1.2 Échantillons avec Mh à J0 dopés avec la solution diluée au dixième

Nous avons comparé les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième pour Mh à J0. Pour rappel, les valeurs brutes sont récapitulées dans le tableau 29 ci-dessous. Les valeurs des écouvillons et des cartes FTA® ont été comparées grâce à un test de Wilcoxon dont la valeur obtenue a été indiquée dans le tableau 38 ci-dessous :

	Valeurs brutes			Moyennes	Écarts types	p	Conclusion
	Séance 1	Séance 2	Séance 3				
<b>J0-EC2</b>	31,98	35,64	31,51	33,04	2,26	0,7	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>J0-FTA2</b>	33,59	32,73	32,62	32,98	0,53		

*Tableau 39 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour Mh, à J0 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes*

On constate que **les valeurs de Ct entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour Mh, ne sont pas significativement différentes à J0.**

#### 3.4.1.2. Échantillons avec Mh à J7

##### 3.4.1.2.1 Échantillons avec Mh à J7 dopés avec la solution pure

Nous avons comparé les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour Mh, à J7. Pour rappel, les valeurs brutes sont récapitulées dans le tableau 30 ci-dessous. Les valeurs des écouvillons et des cartes FTA® ont été comparées grâce à un test de Wilcoxon dont la valeur obtenue a été indiquée dans le tableau 39 ci-dessous :

	Valeurs brutes			Moyennes	Écarts types	p	Conclusion
	Séance 1	Séance 2	Séance 3				
<b>J7-EC1</b>	28,9	29,83	29,34	29,36	0,46	1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>J7-FTA1</b>	30,18	29,23	28,92	29,44	0,66		

*Tableau 40 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour Mh, à J7 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes*

On constate que **les valeurs de Ct entre les écouvillons et les cartes FTA® dopées avec la solution pure, pour Mh, ne sont pas significativement différentes à J7.**

### 3.4.1.2.2 Échantillons avec Mh à J7 dopés avec la solution diluée au dixième

Nous avons comparé les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour Mh, à J7. Pour rappel, les valeurs brutes sont récapitulées dans le tableau 30 ci-dessous. Les valeurs des écouvillons et des cartes FTA® ont été comparées grâce à un test de Wilcoxon dont la valeur obtenue a été indiquée dans le tableau 40 ci-dessous :

	Valeurs brutes			Moyennes	Écarts types	p	Conclusion
	Séance 1	Séance 2	Séance 3				
<b>J7-EC2</b>	31,5	33,29	33,2	32,66	1,01	0,7	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>J7-FTA2</b>	32,76	32,89	32,04	32,56	0,46		

*Tableau 41 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour Mh, à J7 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes*

On constate que **les valeurs de Ct entre les écouvillons et les cartes FTA® dopées avec la solution diluée au dixième, pour Mh, ne sont pas significativement différentes à J7.**

### 3.4.1.3. Échantillons avec Mh à J14

#### 3.4.1.3.1 Échantillons avec Mh à J14 dopés avec la solution pure

Nous avons comparé les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour Mh, à J14. Pour rappel, les valeurs brutes sont récapitulées dans le tableau 30 ci-dessous. Les valeurs des écouvillons et des cartes FTA® ont été comparées grâce à un test de Wilcoxon dont la valeur obtenue a été indiquée dans le tableau 41 ci-dessous :

	Valeurs brutes			Moyenne	Écarts types	p	Conclusion
	Séance 1	Séance 2	Séance 3				
<b>J14-EC1</b>	29,81	31,24	25,3	28,78	3,10	1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>J14-FTA1</b>	30,27	29,58	29,04	29,63	0,62		

*Tableau 42 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour Mh, à J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes*

On constate que **les valeurs de Ct entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour Mh, ne sont pas significativement différentes à J14.**

#### 3.4.1.3.2 Échantillons avec Mh à J14 dopés avec la solution diluée au dixième

Nous avons comparé les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour Mh, à J14. Pour rappel, les valeurs brutes sont récapitulées dans le tableau 30 ci-dessous. Les



valeurs des écouvillons et des cartes FTA® ont été comparées grâce à un test de Wilcoxon dont la valeur obtenue a été indiquée dans le tableau 42 ci-dessous :

	Valeurs brutes			Moyennes	Écarts types	p	Conclusion
	Séance 1	Séance 2	Séance 3				
<b>J14-EC2</b>	33,16	34,88	30,25	32,76	2,34	1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes
<b>J14-FTA2</b>	33,77	33,09	31,77	32,88	1,02		

*Tableau 43 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour Mh, à J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes*

On constate que **les valeurs de Ct entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour Mh, ne sont pas significativement différentes à J14.**

### 3.4.2. Échantillons avec le VRS

#### 3.4.2.1. Échantillons avec le VRS à J0

##### 3.4.2.1.1 Échantillons avec VRS à J0 dopés avec la solution pure

Nous avons comparé les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure pour le VRS à J0. Pour rappel, les valeurs brutes sont récapitulées dans le tableau 32 ci-dessous. Les valeurs des écouvillons et des cartes FTA® ont été comparées grâce à un test de Wilcoxon dont la valeur obtenue a été indiquée dans le tableau 43 ci-dessous :

	Valeurs brutes			Moyennes	Écarts types	p	Conclusion
	Séance 1	Séance 2	Séance 3				
<b>J0-EC1</b>	28,13	29,75	28,82	28,90	0,81	0,1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes
<b>J0-FTA1</b>	30,00	31,24	31,09	30,78	0,68		

*Tableau 44 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour VRS à J0 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes*

On constate que **les valeurs de Ct entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour le VRS ne sont pas significativement différentes à J0, mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes : les cartes FTA® tendent à avoir un Ct plus grand que les écouvillons.**

### 3.4.2.1.2 Échantillons avec VRS à J0 dopés avec la solution diluée au dixième

Nous avons comparé les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième pour le VRS à J0. Pour rappel, les valeurs brutes sont récapitulées dans le tableau 32 ci-dessous. Les valeurs des écouvillons et des cartes FTA® ont été comparées grâce à un test de Wilcoxon dont la valeur obtenue a été indiquée dans le tableau 44 ci-dessous :

	Valeurs brutes			Moyennes	Écarts types	p	Conclusion
	Séance 1	Séance 2	Séance 3				
<b>J0-EC2</b>	31,82	33,17	32,22	32,44	0,68	0,1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu  Les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes
<b>J0-FTA2</b>	33,92	35,75	35,91	35,19	1,11		

*Tableau 45 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour le VRS à J0 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes*

On constate que **les valeurs de Ct entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour le VRS ne sont pas significativement différentes à J0, mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes : les cartes FTA® tendent à avoir un Ct plus grand que les écouvillons.**

### 3.4.2.2. Échantillons avec le VRS à J7

#### 3.4.2.2.1 Échantillons avec le VRS à J7 dopés avec la solution pure

Nous avons comparé les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour le VRS à J7. Pour rappel, les valeurs brutes sont récapitulées dans le tableau 33 ci-dessous. Les valeurs des écouvillons et des cartes FTA® ont été comparées grâce à un test de Wilcoxon dont la valeur obtenue a été indiquée dans le tableau 45 ci-dessous :

	Valeurs brutes			Moyennes	Écarts types	p	Conclusion
	Séance 1	Séance 2	Séance 3				
<b>J7-EC1</b>	28,9	29,92	29,05	29,29	0,55	0,1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu  Les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes
<b>J7-FTA1</b>	31,39	31,76	31,57	31,57	0,18		

*Tableau 46 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure pour le VRS à J7 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes*

On constate que **les valeurs de Ct entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour le VRS ne sont pas significativement différentes à J7 mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes : les cartes FTA® tendent à avoir un Ct plus grand que les écouvillons.**

#### 3.4.2.2.2 Échantillons avec le VRS à J7 dopés avec la solution diluée au dixième

Nous avons comparé les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour VRS à J7. Pour rappel, les valeurs brutes sont récapitulées dans le tableau 33 ci-dessous. Les valeurs des écouvillons et des cartes FTA® ont été comparées grâce à un test de Wilcoxon dont la valeur obtenue a été indiquée dans le tableau 46 ci-dessous :

	Valeurs brutes			Moyennes	Écarts types	p	Conclusion
	Séance 1	Séance 2	Séance 3				
<b>J7-EC2</b>	33,05	33,05	32,73	32,94	0,18	0,07652	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu  Les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes
<b>J7-FTA2</b>	34,11	35,21	34,4	34,57	0,57		

*Tableau 47 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième pour le VRS à J7 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes*

On constate que **les valeurs de Ct entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour VRS ne sont pas significativement différentes à J7 mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes : les cartes FTA® tendent à avoir un Ct plus grand que les écouvillons.**

### 3.4.2.3. Échantillons avec le VRS à J14

#### 3.4.2.3.1 Échantillons avec le VRS à J14 dopés avec la solution pure

Nous avons comparé les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour le VRS, à J14. Pour rappel, les valeurs brutes sont récapitulées dans le tableau 34 ci-dessous. Les valeurs des écouvillons et des cartes FTA® ont été comparées grâce à un test de Wilcoxon dont la valeur obtenue a été indiquée dans le tableau 47 ci-dessous :

	Valeurs brutes			Moyennes	Écarts types	p	Conclusion
	Séance 1	Séance 2	Séance 3				
<b>J14-EC1</b>	28,96	30,69	30,04	29,90	0,87	0,1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes
<b>J14-FTA1</b>	31,77	33,60	31,87	32,41	1,03		

Tableau 48 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour le VRS à J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes

On constate que **les valeurs de Ct entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution pure, pour le VRS ne sont pas significativement à J14 mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes : les cartes FTA® tendent à avoir un Ct plus grand que les écouvillons.**

#### 3.4.2.3.2 Échantillons avec le VRS à J14 dopés avec la solution diluée au dixième

Nous avons comparé les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour le VRS, à J14. Pour rappel, les valeurs brutes sont récapitulées dans le tableau 34 ci-dessous. Les valeurs des écouvillons et des cartes FTA® ont été comparées grâce à un test de Wilcoxon dont la valeur obtenue a été indiquée dans le tableau 48 ci-dessous :

	Valeurs brutes			Moyennes	Écarts types	p	Conclusion
	Séance 1	Séance 2	Séance 3				
<b>J14-EC2</b>	33,04	33,79	34,01	33,61	0,51	0,1	On accepte H0 au risque d'erreur B inconnu Les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais $p \leq 0,10$ donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes
<b>J14-FTA2</b>	35,87	36,60	35,09	35,85	0,75		

Tableau 49 : Rappel des valeurs brutes, calcul des moyennes et écarts types et test de Wilcoxon entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour le VRS à J14 avec H0 : les moyennes ne sont pas significativement différentes, mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes

On constate que **les valeurs de Ct entre les écouvillons et les cartes FTA® dopés avec la solution diluée au dixième, pour le VRS ne sont pas significativement à J14 mais  $p \leq 0,10$  donc il y a une tendance à avoir des moyennes différentes.**

#### 3.4.3. Conclusion

En ce qui concerne la comparaison des résultats obtenus avec écouvillon versus carte FTA®, **qu'ils soient dopés avec la solution pure ou avec la solution diluée au dixième, pour la recherche**

de Mh, on constate que les moyennes ne sont pas significativement différentes entre les écouvillons et les cartes FTA®. Cependant, pour la recherche du VRS, on constate que, les échantillons dopés avec la solution mère ou la solution diluée au dixième ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes mais qui tendent à le devenir, avec à chaque fois les Ct des cartes FTA qui sont plus élevés que les Ct des écouvillons.

### 3.5. Reproductibilité des manipulations

Tout d'abord, nous allons déterminer si les manipulations au sein même d'une séance et entre les différentes séances sont répétables.

Pour cela, nous allons comparer toutes les valeurs obtenues par des échantillons similaires en prenant en compte l'incertitude liée à la mesure du Ct qui est de +/- 3 Ct. Nous nous limiterons à une comparaison graphique des résultats compte tenu du faible nombre d'échantillons.

#### 3.5.1. Reproductibilité des échantillons avec Mh

##### 3.5.1.1. Écouvillons Mh

##### 3.5.1.1.1. Écouvillons Mh à J0

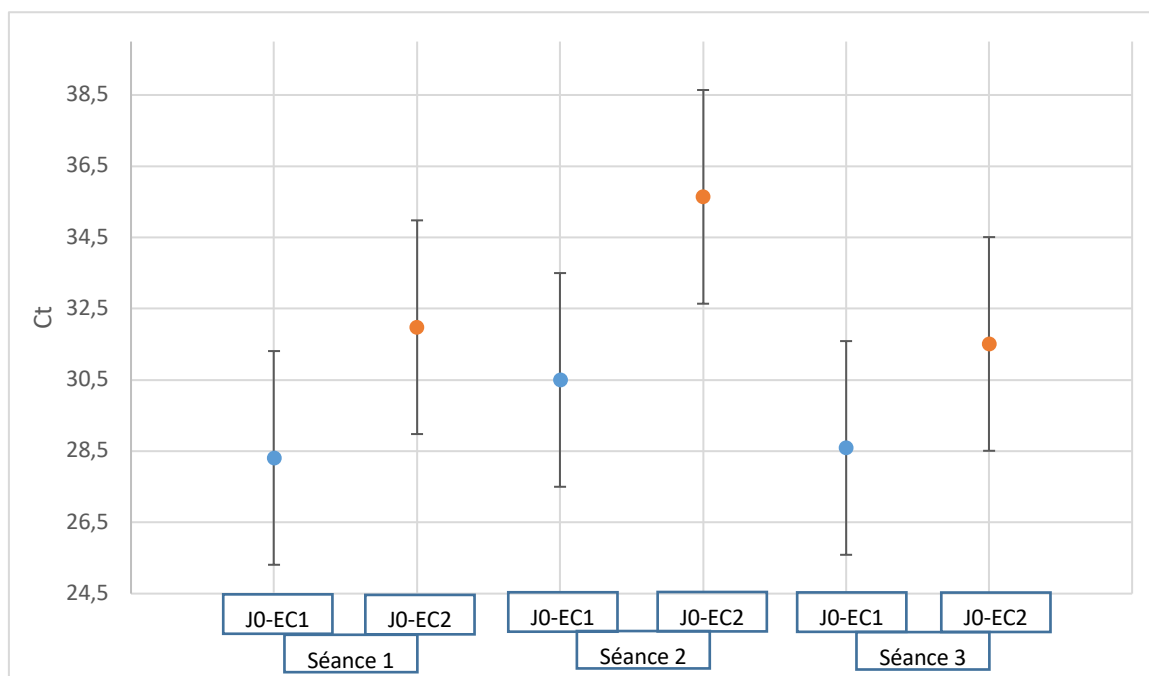


Figure 16 : Reproductibilité des écouvillons Mh à J0

On constate sur la figure 16 que les écouvillons 1 sont graphiquement comparables entre chaque séance et que les écouvillons 2 sont graphiquement comparables entre chaque séance également. La reproductibilité de la manipulation est donc acceptable.

### 3.5.1.1.2. Écouvillons Mh à J7

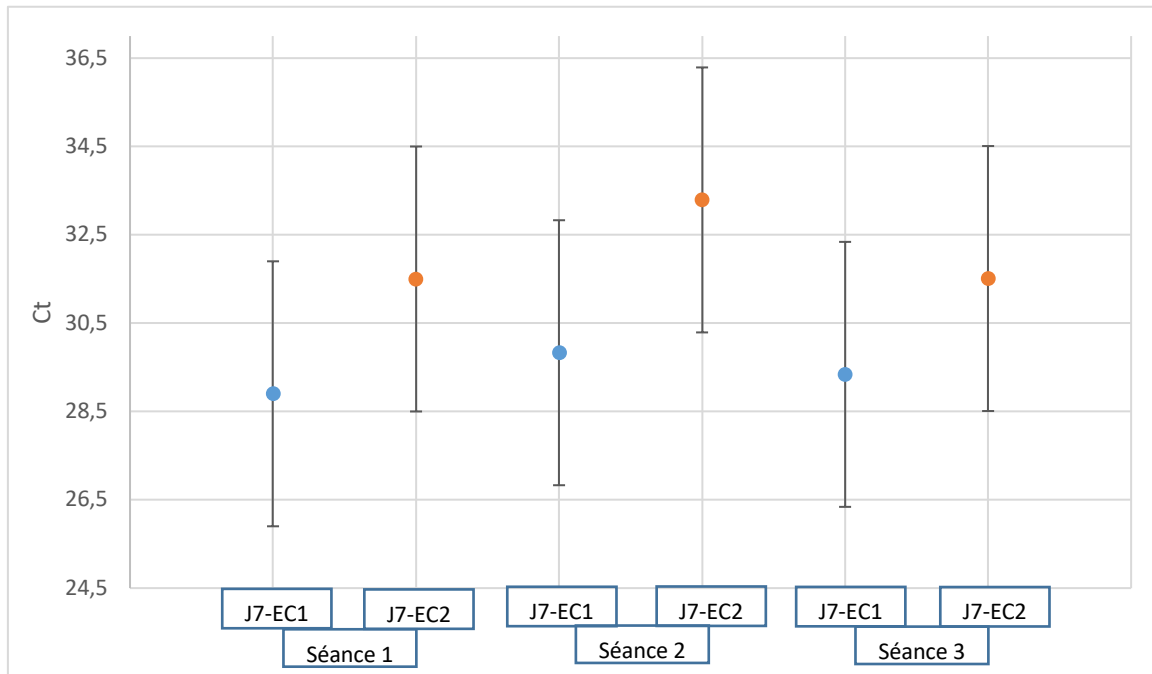


Figure 17 : Reproductibilité des écouvillons Mh à J7

On constate sur la figure 17 que, **entre chaque séance, les écouvillons 1 sont graphiquement comparables entre eux et les écouvillons 2 sont graphiquement comparables entre eux. La reproductibilité de la manipulation est donc acceptable.**

### 3.5.1.1.3. Écouvillons Mh à J14

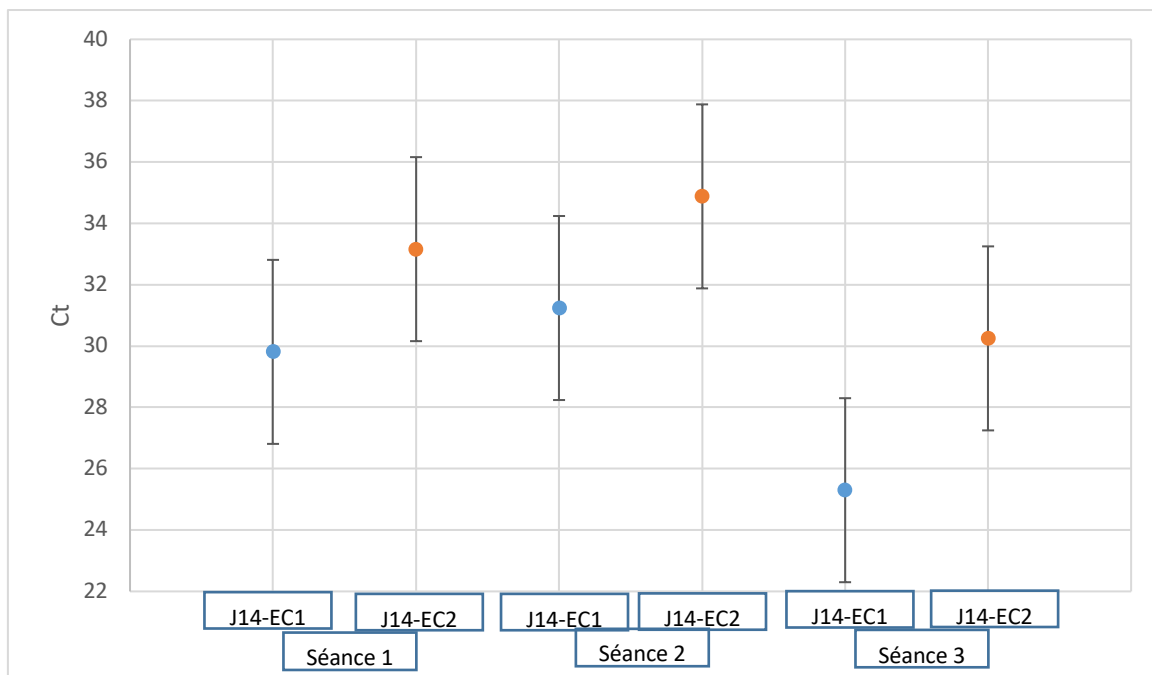


Figure 18 : Reproductibilité des écouvillons Mh à J14

On constate sur la figure 18 que, la valeur de Ct de J14-EC1 de la séance 3 sort un peu du lot mais globalement, entre chaque séance, les écouvillons 1 sont graphiquement comparables entre eux et les écouvillons 2 sont graphiquement comparables entre eux. La reproductibilité de la manipulation est donc acceptable.

#### 3.5.1.1.4. Bilan écouvillons Mh

On constate que les différents écouvillons réalisés lors des 3 séances ont des valeurs de Ct graphiquement comparables et donc on conclut à une reproductibilité des manipulations acceptable.

### 3.5.1.2. Cartes FTA® Mh

#### 3.5.1.2.1. Cartes FTA® Mh à J0

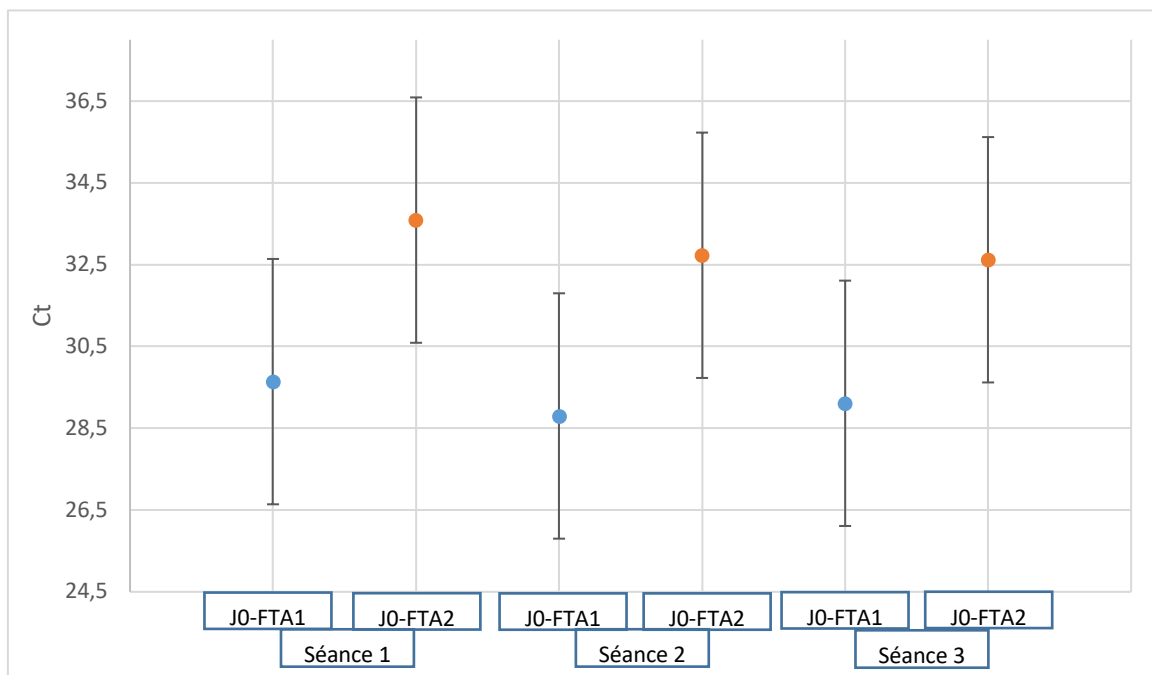


Figure 19 Reproductibilité des cartes FTA® Mh à J0

On constate sur la figure 19 que, entre chaque séance, les cartes FTA® 1 sont graphiquement comparables entre elles et les cartes FTA® 2 sont graphiquement comparables entre elles. La reproductibilité de la manipulation est donc acceptable.

### 3.5.1.2.2. Cartes FTA® Mh à J7

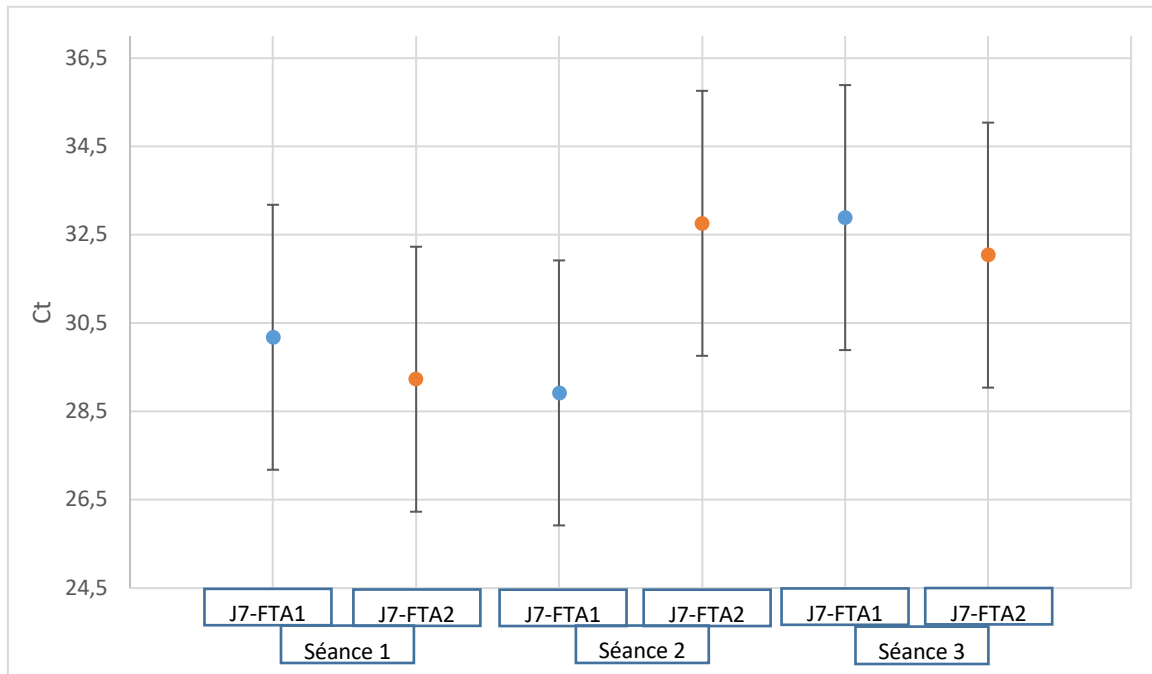


Figure 20 : Reproductibilité des cartes FTA® Mh à J7

On constate sur la figure 20 que, **entre chaque séance, les cartes FTA® 1 sont graphiquement comparables entre elles et les cartes FTA® 2 sont graphiquement comparables entre elles. La reproductibilité de la manipulation est donc acceptable.**

### 3.5.1.2.3. Cartes FTA® Mh à J14

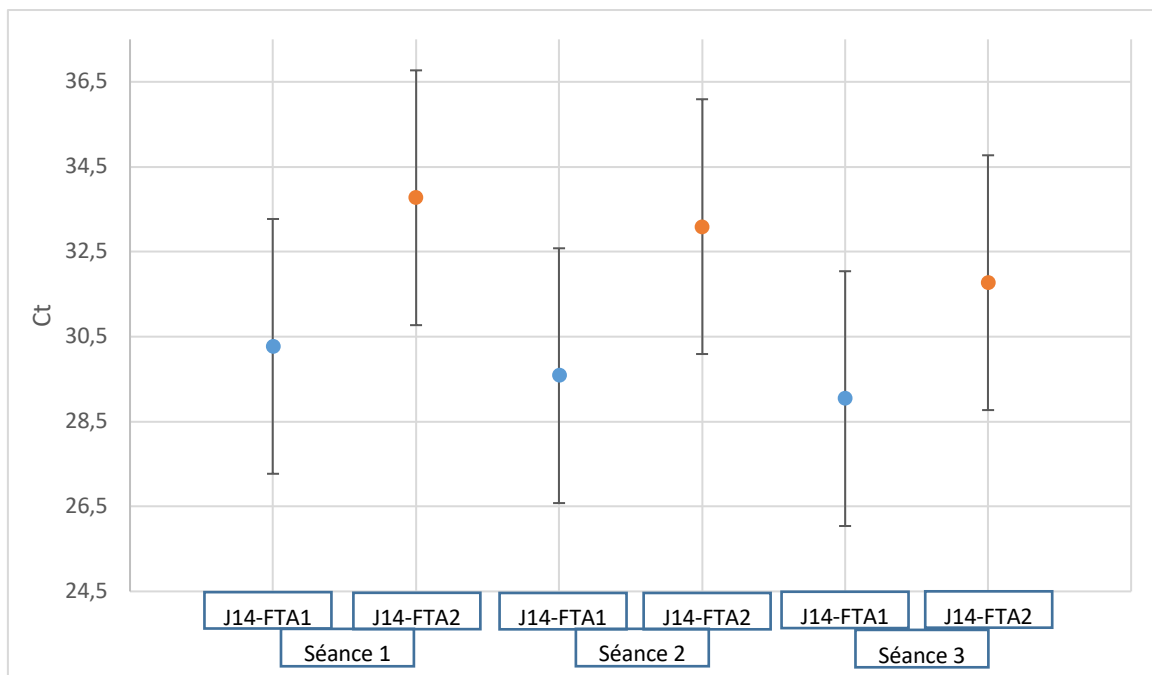


Figure 21 : Reproductibilité des cartes FTA® Mh à J14



On constate sur la figure 21 que, **entre chaque séance, les cartes FTA® 1 sont graphiquement comparables entre elles et les cartes FTA® 2 sont graphiquement comparables entre elles. La reproductibilité de la manipulation est donc acceptable.**

#### 3.5.1.2.4. Bilan cartes FTA® Mh

On constate qu'il y a **une reproductibilité acceptable lors des manipulations de cartes FTA® avec Mh.**

### 3.5.2. Reproductibilité des échantillons avec le VRS

#### 3.5.2.1. Écouvillons VRS

##### 3.5.2.1.1. Écouvillons VRS à J0

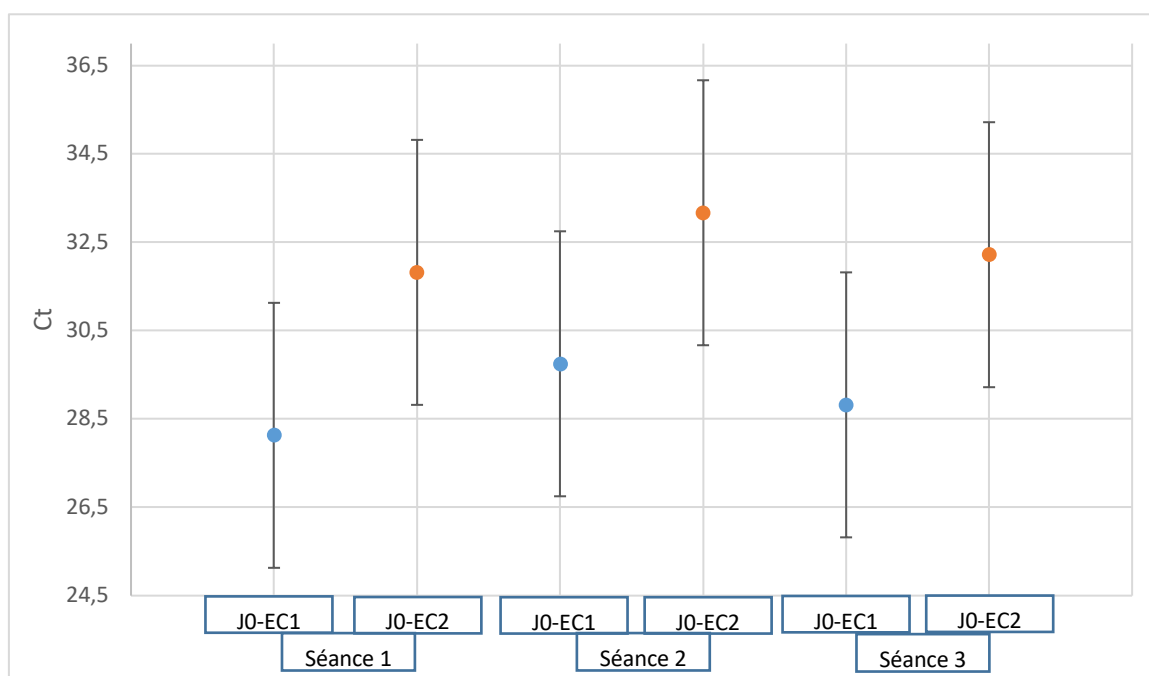


Figure 22 : Reproductibilité des écouvillons VRS à J0

On constate sur la figure 22 que, **entre chaque séance, les écouvillons 1 sont graphiquement comparables entre eux et les écouvillons 2 sont graphiquement comparables entre eux. La reproductibilité de la manipulation est donc acceptable.**

### 3.5.2.1.2. Écouvillons VRS à J7

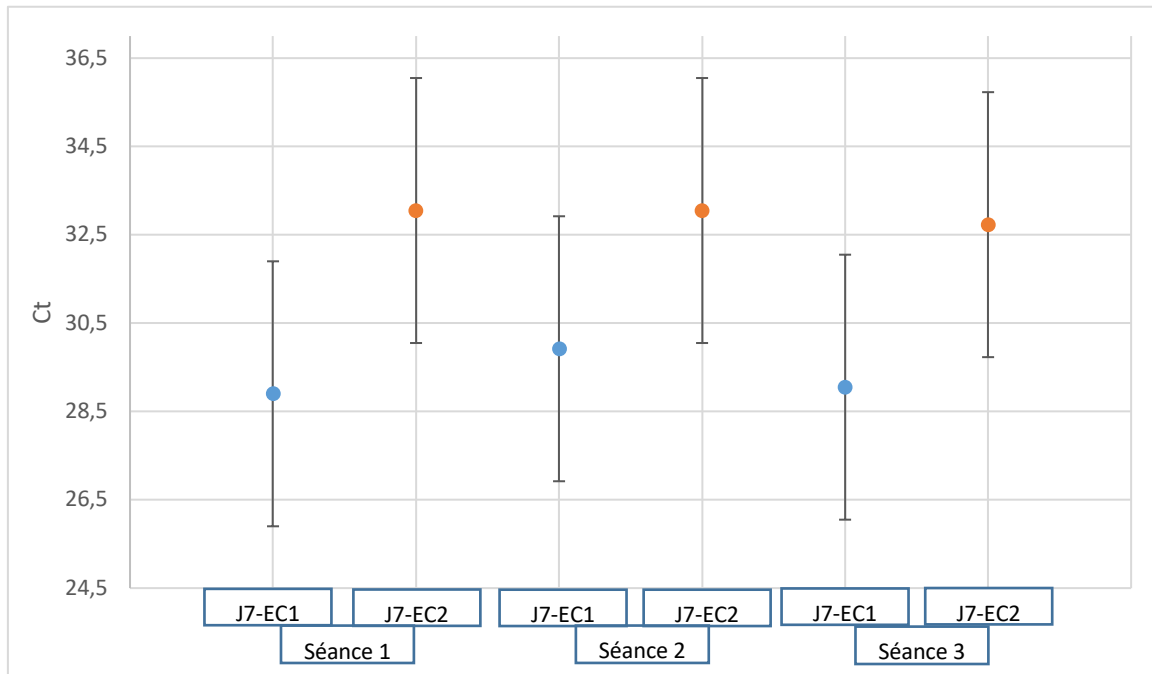


Figure 23 : Reproductibilité des écouvillons VRS à J7

On constate sur la figure 23 que, **entre chaque séance, les écouvillons 1 sont graphiquement comparables entre eux et les écouvillons 2 sont graphiquement comparables entre eux. La reproductibilité de la manipulation est donc acceptable.**

### 3.5.2.1.3. Écouvillons VRS à J14

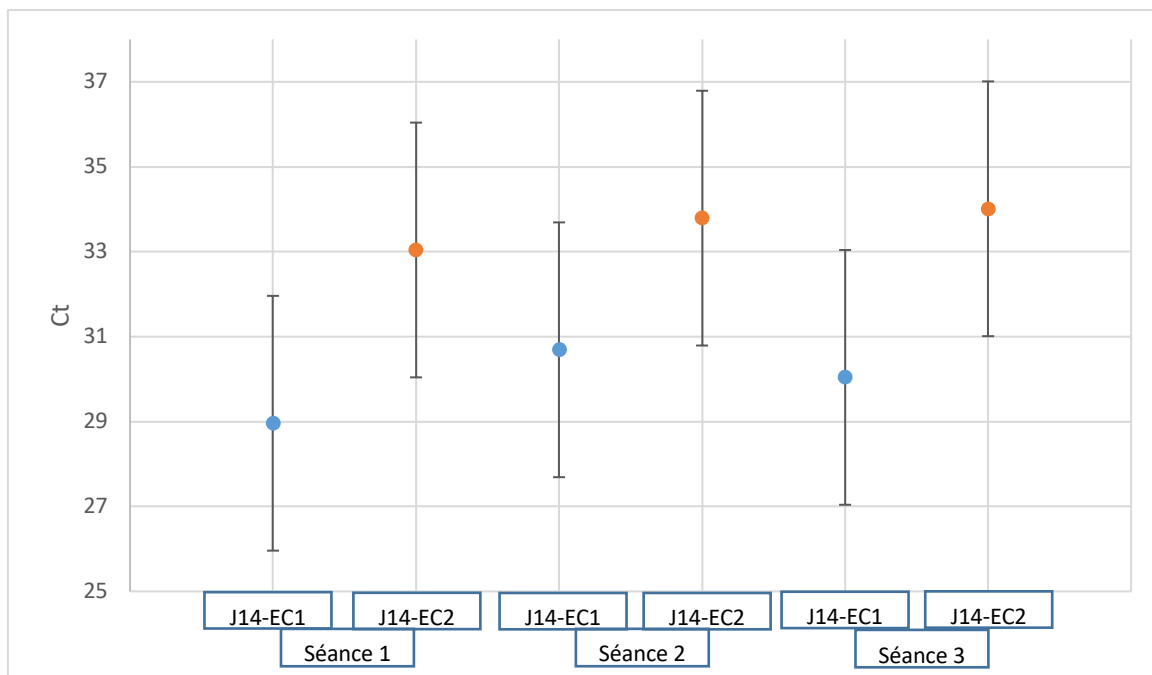


Figure 24 : Répétabilité des écouvillons VRS à J14

On constate sur la figure 24 que, **entre chaque séance, les écouvillons 1 sont graphiquement comparables entre eux et les écouvillons 2 sont graphiquement comparables entre eux. La reproductibilité de la manipulation est donc acceptable.**

#### 3.5.2.1.4. Bilan écouvillons VRS

On constate qu'il y a une **reproductibilité acceptable lors des manipulations des écouvillons avec le VRS.**

#### 3.5.2.2. Cartes FTA® VRS

##### 3.5.2.2.1. Cartes FTA® VRS à J0

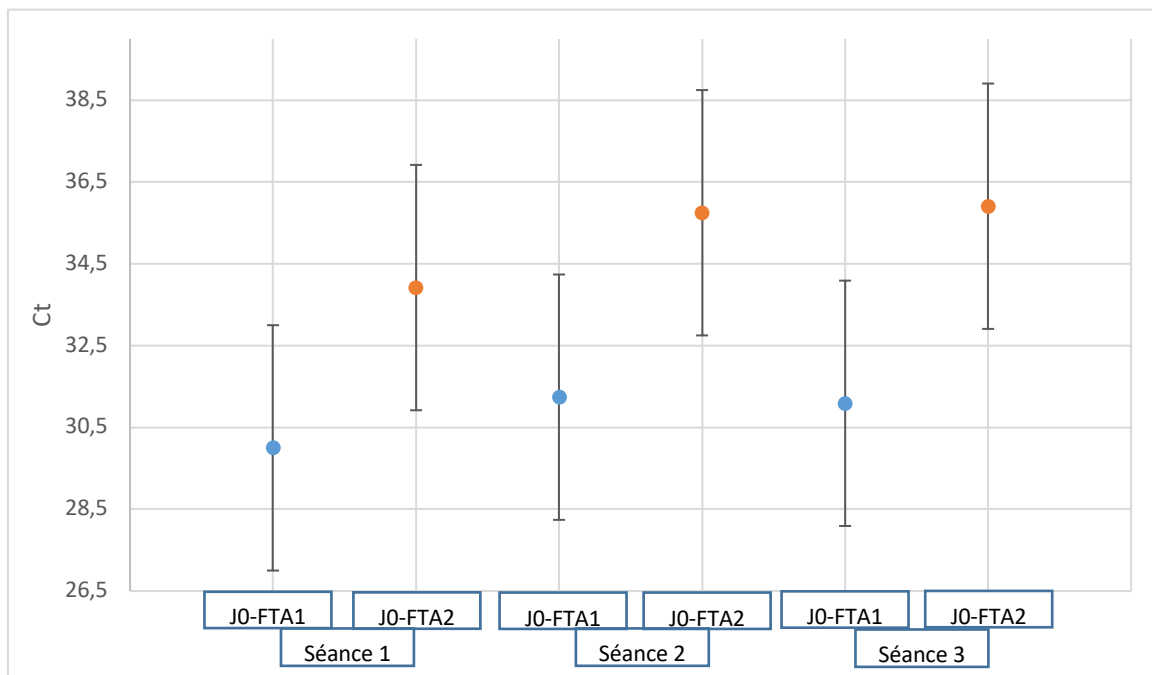


Figure 25 : Reproductibilité des cartes FTA® VRS à J0

On constate sur la figure 25 que, **entre chaque séance, les cartes FTA® 1 sont graphiquement comparables entre elles et les cartes FTA® 2 sont graphiquement comparables entre elles. La reproductibilité de la manipulation est donc acceptable.**

### 3.5.2.2.2. Cartes FTA® VRS à J7

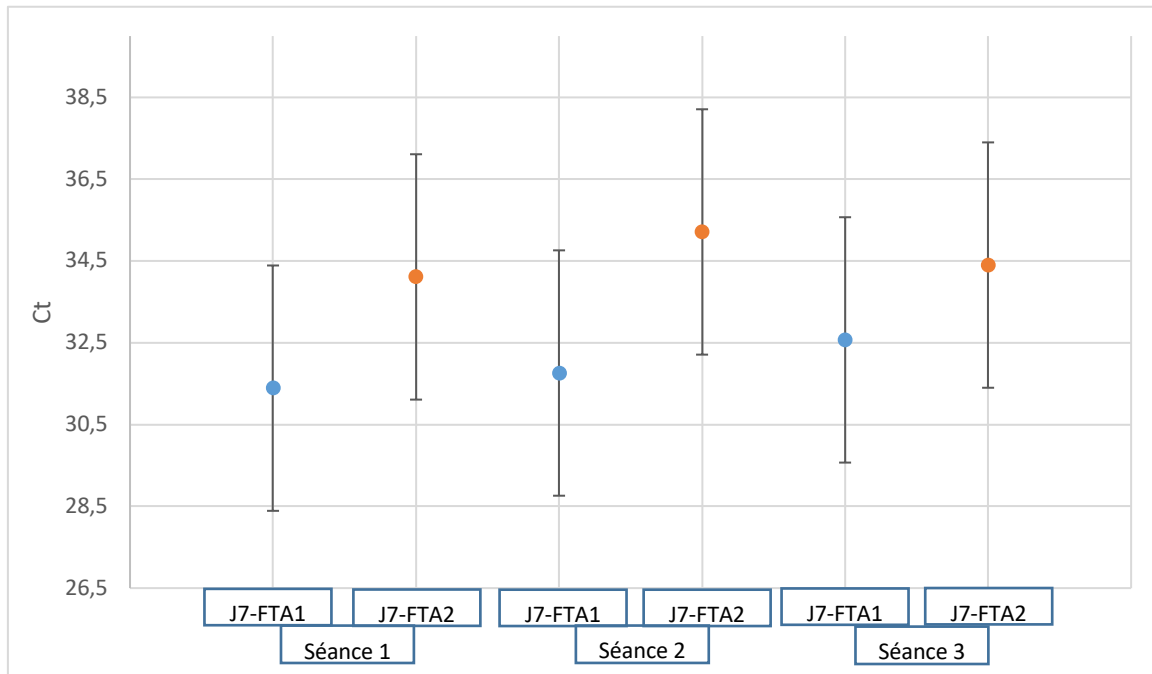


Figure 26 : Reproductibilité des cartes FTA® VRS à J7

On constate sur la figure 26 que, **entre chaque séance, les cartes FTA® 1 sont graphiquement comparables entre elles et les cartes FTA® 2 sont graphiquement comparables entre elles. La reproductibilité de la manipulation est donc acceptable.**

### 3.5.2.2.3. Cartes FTA® VRS à J14

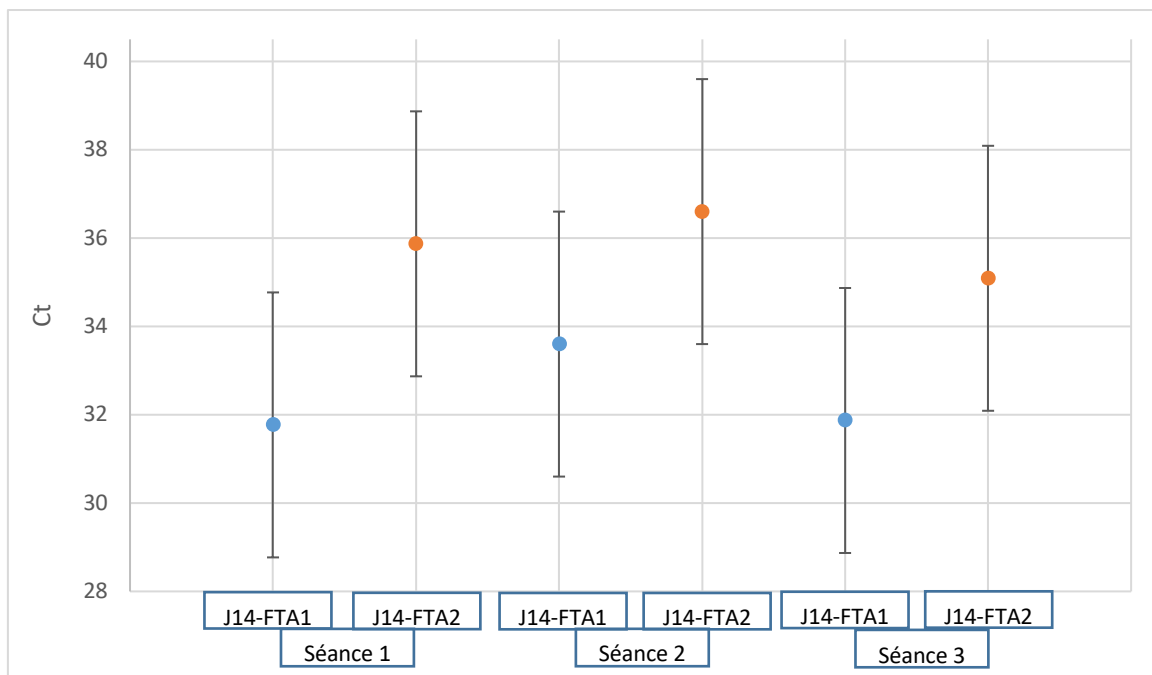


Figure 27 : Reproductibilité des cartes FTA® VRS à J14

On constate sur la figure 27 que, **entre chaque séance, les cartes FTA® 1 sont graphiquement comparables entre elles et les cartes FTA® 2 sont graphiquement comparables entre elles. La reproductibilité de la manipulation est donc acceptable.**

#### **3.5.2.2.4. Bilan cartes FTA® VRS**

On constate qu'il y a une **reproductibilité acceptable lors des manipulations des cartes FTA® avec VRS.**

#### **3.5.3. Conclusion reproductibilité**

On peut conclure que **tous les échantillons à comparer sont comparables.**

**La reproductibilité de l'étude est donc graphiquement acceptable.**

On notera également que le calibrage de la solution de Mh et VRS a été fait une unique fois. Il aurait été préférable de le faire au moins 3 fois afin de vérifier également la reproductibilité de la manipulation et de s'assurer que le Ct obtenu pour le calibrage de la solution n'est pas dû au hasard.

## **4. Discussion**

Tout d'abord, nous allons discuter des résultats obtenus, puis nous discuterons des limites de cette étude.

#### 4.1. Discussion sur les résultats obtenus

Voici un rappel des résultats obtenus avec nos manipulations dans le tableau 49 ci-dessous :

<b>Étude de la stabilité des échantillons</b>			
<b>Stabilité des écouvillons avec Mh</b>		Dopés avec la solution pure	Concentrations non significativement différentes
		Dopés avec la solution diluée au dixième	Concentrations non significativement différentes
<b>Stabilité des cartes FTA® avec Mh</b>		Dopés avec la solution pure	Concentrations non significativement différentes
		Dopés avec la solution diluée au dixième	Concentrations non significativement différentes
<b>Stabilité des écouvillons avec VRS</b>		Dopés avec la solution pure	Concentrations non significativement différentes
		Dopés avec la solution diluée au dixième	Concentrations non significativement différentes
<b>Stabilité des cartes FTA® avec VRS</b>		Dopés avec la solution pure	Concentrations non significativement différentes mais tendance à avoir des concentrations différentes
		Dopés avec la solution diluée au dixième	Concentrations non significativement différentes
<b>Comparaison entre l'utilisation des écouvillons et des cartes FTA</b>			
<b>Avec MH</b>	À J0	Dopés avec la solution pure	Concentrations non significativement différentes
		Dopés avec la solution diluée au dixième	Concentrations non significativement différentes
	À J7	Dopés avec la solution pure	Concentrations non significativement différentes
		Dopés avec la solution diluée au dixième	Concentrations non significativement différentes
	À J14	Dopés avec la solution pure	Concentrations non significativement différentes
		Dopés avec la solution diluée au dixième	Concentrations non significativement différentes
<b>Avec VRS</b>	À J0	Dopés avec la solution pure	Concentrations non significativement différentes mais tendance à avoir des concentrations différentes
		Dopés avec la solution diluée au dixième	Concentrations non significativement différentes mais tendance à avoir des concentrations différentes
	À J7	Dopés avec la solution pure	Concentrations non significativement différentes mais tendance à avoir des concentrations différentes
		Dopés avec la solution diluée au dixième	Concentrations non significativement différentes mais tendance à avoir des concentrations différentes
	À J14	Dopés avec la solution pure	Concentrations non significativement différentes mais tendance à avoir des concentrations différentes
		Dopés avec la solution diluée au dixième	Concentrations non significativement différentes mais tendance à avoir des concentrations différentes

Tableau 50 : Rappel des résultats obtenus

En ce qui concerne la stabilité des échantillons, on constate que, que ce soit concernant la recherche de Mh ou de VRS, avec la solution pure ou la solution diluée au dixième, **il n’y a pas de différence significative de concentration dans le temps sur les écouvillons et sur les cartes FTA®**, cependant, **on constate une tendance à avoir des concentrations différentes dans le temps avec les cartes FTA® dopées avec la solution mère.**

On constate également que pour les manipulations avec Mh et VRS, le fait d’utiliser un écouvillon ou une carte FTA® ne change rien, **il n’y a pas de différence significative entre l’utilisation d’un écouvillon ou d’une carte FTA® pour la recherche de Mh ou de VRS** dans notre étude, cependant, **on constate une tendance à avoir des concentrations différentes entre écouvillons et cartes FTA concernant la recherche de VRS.**

Ces tendances à avoir des concentrations différentes sont, dans les deux cas, observées avec **l’utilisation de cartes FTA® pour la recherche de VRS.** Nous pouvons alors nous demander si la **conservation de matériel génétique de type ARN n’est pas plus complexe**, ce qui entraînerait les tendances observées.

Dans la littérature, on peut retrouver plusieurs études comparant la sensibilité d’utilisation entre écouvillons et cartes FTA® comme résumé dans le tableau 50.

Agent pathogène/Cible étudiée	Résultats	Référence
HPV (Human Papillomavirus)	Meilleure sensibilité des écouvillons par rapport aux cartes FTA® (mais auto-tests)	(CATARINO <i>et al.</i> , 2015)
HPV	Écouvillons et cartes FTA® comparables	(DONG <i>et al.</i> , 2017)
Bactéries entériques	Meilleure préservation des échantillons sur carte FTA®	(YUE ET JIA, 2021)
ADN	Meilleure sensibilité sur cartes FTA®	(MILNE <i>et al.</i> , 2006)
ADN	Meilleure préservation des échantillons sur carte FTA®	(KIRGIZ ET CALLOWAY, 2017)

*Tableau 51 : Études comparant les écouvillons aux cartes FTA®*

Il en ressort globalement que **les cartes FTA sont toujours au moins comparables si ce n’est plus sensibles que les écouvillons**, sauf pour la première étude du tableau mais les prélèvements étaient auto-réalisés par les patients ce qui est un biais.

De plus, on retrouve dans la littérature plusieurs études montrant que **l’utilisation de cartes FTA® permet d’inactiver l’agent pathogène**, ce qui permet un transport sécurisé de l’échantillon sans risques de contaminations : l’étude de (ABDELWHAB *et al.*, 2011) montre que **l’infectiosité des influenza virus aviaires de sous-type H6N2 et H5N1 est nulle en moins d’une heure** après le dépôt du prélèvement sur la carte FTA®, et l’étude de (KRAMBRICH *et al.*, 2022) montre que **les échantillons contenant le virus Sindbis, le virus du Chikungunya et le virus de l’encéphalite japonaise conservés sur carte FTA® sont inactifs.**

Un travail de LIANG *et al.* qui avait pour but d’étudier la stabilité d’échantillons, conservés sur des cartes FTA, contenant les virus du BVD, le VRSB, le BCoV et le virus de l’IBR a montré qu’il n’y avait **pas de différence significative de sensibilité des échantillons lorsqu’ils sont conservés à des températures extrêmes** (chaudes ou froides) et **simulant un délai de livraison long** au laboratoire

(entre 7 et 14 jours). Ainsi, cette étude nous permet d'avoir un **point commun avec la nôtre (la stabilité du VRS sur la carte FTA® dans le temps)** et de pouvoir potentiellement **extrapoler nos résultats aux autres virus respiratoires que sont le BVDV, le BCoV et le BoHV1** qui ont été étudiés ici. Il serait intéressant d'effectuer cette même étude avec les **bactéries** responsables d'affections respiratoires pour pouvoir extrapoler de la même manière nos résultats avec Mh à ces autres agents pathogènes.

#### 4.2. Limites de l'étude

Notre étude doit cependant être nuancée car elle comporte de nombreuses limites :

- Étant donné nos contraintes matérielles et financières, nous avons été contraints de travailler avec un **faible nombre d'échantillons** ce qui entraîne fatalement un **manque de puissance de nos analyses statistiques**. Il serait nécessaire d'effectuer la même étude avec un **plus grand nombre d'échantillons** afin de déterminer si l'on obtient des résultats comparables à ceux de notre étude.
- Les échantillons ont été dopés avec une **solution pure** ne contenant que les **deux agents pathogènes (Mh et VRS) que l'on souhaitait rechercher**, or des échantillons biologiques, en conditions réelles sont beaucoup plus **polycontaminés et plus « sales »**. Il serait alors nécessaire d'effectuer une étude avec des **échantillons biologiques en condition réelles** afin de déterminer si l'on obtient des résultats comparables avec ceux de notre étude.
- Dans notre étude, nous avons recherché uniquement deux agents pathogènes respiratoires, et **pour la recherche du VRS sur les cartes FTA®, on observe une tendance à avoir des moyennes différentes**. Étant donné qu'il s'agit d'un **virus à ARN** et que l'on sait que cet acide nucléique est **plus fragile** que l'ADN, cela pourrait potentiellement être une explication à cette tendance observée. Il serait alors intéressant d'effectuer **une étude avec plus d'agents pathogènes respiratoires** afin de déterminer **si cette tendance à la différence, pour les agents pathogènes à ARN, est remarquée ou non**.

Cependant, les cartes FTA® permettent un stockage facilité des prélèvements respiratoires, elles permettent d'inactiver les agents pathogènes ainsi recueillis et sont facile d'utilisation, et nous avons montré lors de cette étude que l'on peut mettre en évidence de faibles quantités d'acides nucléiques de Mh et de VRS et la réponse au vétérinaire devant être une réponse binaire, donc , **les cartes FTA® semblent être un outil d'envoi de prélèvement et de stockage d'échantillon utilisable dans la recherche d'agents pathogènes respiratoires bactériens ou viraux.**



# Conclusion

---

**Les maladies respiratoires chez les bovins font partie des dominantes pathologiques de l'espèce.** En effet, les **particularités anatomiques** de leur appareil respiratoire les y prédisposent : le faible rapport entre le volume pulmonaire et la masse musculaire, leur fréquence respiratoire plus élevée en proportion du poids, l'augmentation du temps de transit de l'air dans les voies respiratoires, la compartimentation importante des poumons et une immunité locale moins développée par rapport à d'autres espèces sont autant de facteurs qui prédisposent aux pathologies respiratoires.

Les agents pathogènes en cause sont nombreux. On y compte parmi les virus l'agent de la **Rhinotrachéite Infectieuse Bovine**, le virus **Parainfluenza bovin de type 3**, le virus de la Diarrhée Virale Bovine, le Virus Respiratoire Syncytial Bovin et le Coronavirus Bovin. Les bactéries pouvant être en cause sont les **pasteurelles pulmonaires** parmi lesquelles ***Mannheimia haemolytica***, ***Pasteurella multocida*** ou encore ***Histophilus somni***, et les **mycoplasmes pulmonaires** comme ***Mycoplasma bovis***. La **dictyocaulose** est la seule maladie parasitaire des voies respiratoires chez les bovins.

De plus, dans les conditions d'élevage des bovins, on retrouve un grand nombre de **facteurs environnementaux prédisposant aux maladies respiratoires** comme les **stress**, la **mise en bâtiment**, l'**hygiène** qui peut être défectueuse, les **changements alimentaires**, ...

Ainsi, le vétérinaire dispose de plusieurs méthodes pour déterminer l'origine étiologique des pathologies respiratoires chez les bovins comme la **culture virologique**, la **PCR** ou la **bactériologie**, qui nécessitent **l'élaboration de prélèvements respiratoires**. Ces prélèvements peuvent être réalisés par le biais **d'écouvillonnage nasal profond**, **d'aspiration trans-trachéale**, de **lavage broncho-alvéolaire**, ou de **prélèvement de poumon** lors d'autopsie. Cependant, ces prélèvements doivent respecter un conditionnement et une méthode d'acheminement au laboratoire stricte afin de ne pas altérer la qualité du prélèvement : pour les analyses bactériologiques, ils doivent tous être acheminés sous **couvert du froid positif (4°C)** idéalement **en moins de 24 à 48h** selon les prélèvements, voire congelés au-delà et pour les analyses virologiques, **moins de 24h sous couvert du froid positif, congelé au-delà** pour les cultures et **moins de 24h à température ambiante, puis jusqu'à 72h sous couvert du froid positif et congelés au-delà** pour les PCR.

Cependant, la pratique de la médecine vétérinaire en milieu rural est souvent soumise à des **variations de température** et les vétérinaires ne sont **souvent peu voire pas équipés d'outils pouvant réfrigérer ou conserver au frais les prélèvements**. De plus, leur méthode de travail en itinérance fait **qu'ils ne peuvent repasser à la clinique juste après avoir fait un prélèvement** pour le déposer au frais, ils se doivent parfois de continuer leur tournée et n'ont l'occasion de retourner à la clinique qu'une à deux fois par jour. De ce fait, **les prélèvements respiratoires ainsi stockés dans leur voiture peut subir de fortes variations de température pouvant altérer leur qualité**. C'est dans cette optique que l'on a pensé cette étude visant **à montrer qu'il existe aujourd'hui une méthode de stockage des prélèvements respiratoires pouvant pallier ce risque de dénaturation des prélèvements par l'environnement de travail du vétérinaire rural : la carte FTA®.**

**La carte FTA® est un papier filtre traité de façon à inactiver par contact le virus ou la bactérie qui y est déposé et se conserve à température ambiante, permettant un transport sécurisé et facilité du prélèvement respiratoire chez les bovins dans la pratique vétérinaire en milieu rural. Nous avons tenté de déterminer si les prélèvements conservés sur carte FTA® sont aussi stables dans le temps que les écouvillons et si leur qualité est similaire à celle des écouvillons.** Pour des raisons de faisabilité et des raisons économiques, nous nous sommes restreints dans l'étude au VRS et à Mh et nous avons réalisé des écouvillons et des cartes FTA® d'une suspension de ces deux agents pathogènes que nous avons stockés comme des prélèvements lambda et analysés par PCR à J0, J7 et J14. Nous avons ainsi analysé un écouvillon et une carte FTA® à J0, J7 et J14 et nous avons répété la manipulation sur 3 séances différentes.

L'étude de la stabilité des échantillons dans le temps a montré que **les écouvillons et les cartes FTA® avec Mh et le VRS sont restés des prélèvements suffisamment stables dans le temps pour pouvoir être utilisés à des fins diagnostiques.**

La comparaison de la qualité du prélèvement entre écouvillon et carte FTA® a montré que **les deux méthodes sont comparables à J0, J7 et J14.**

De plus, chaque analyse a été répétée 3 fois sur les 3 séances de manipulation, et il semble que **la reproductibilité soit correcte.**

Ainsi, notre étude a montré **qu'il n'existe pas de différence significative sur la qualité et le vieillissement entre les prélèvements stockés sur écouvillons ou sur cartes FTA® pour Mh et VRS jusqu'à 14 jours dans des conditions usuelles de stockage dans des conditions de laboratoire.**

De ce fait, étant donnés les **avantages d'utilisation des cartes FTA®**, elles représentent une **alternative de stockage des prélèvements respiratoires pouvant contrer les inconvénients thermiques et temporels rencontrés lors de la pratique de la médecine vétérinaire en milieu rural.**

Il serait intéressant d'effectuer cette même étude **avec d'autres agents pathogènes respiratoires** que Mh et le VRS, même si une étude de Liang et al. a montré la même tendance que nos résultats sur les virus de la BVD, le BCoV et l'IBR. Il serait également nécessaire de **refaire notre étude avec un nombre d'échantillons plus conséquents** afin d'avoir une **meilleure puissance statistique** mais également en recherchant **plus d'agents pathogènes respiratoires** et de constater si la **conservation des acides nucléiques de types ARN** a également **tendance à être différente sur les cartes FTA®**. Cette même étude réalisée par Liang et al. a également **soumis les cartes FTA® à des températures extrêmes (chaudes et froides)** ce qui nous conforte encore plus sur l'adaptation de ce mode de stockage de prélèvement dans les conditions du vétérinaire rural itinérant.

# Liste des références bibliographiques

---

ABDELWHAB E.M., LÜSCHOW D., HARDER T.C. et al. (2011) The use of FTA® filter papers for diagnosis of avian influenza virus. *Journal of Virological Methods* n°174, p.120-122. [<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.017>]

BELBIS G. (2017) Pestiviroses des ruminants. Polycopié. Maisons-Alfort, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité de Pathologie du Bétail

CAMUSET P. (2021) La dictyocaulose. *In PathoBet Online*. [<https://www.pathobetonline.fr/upload/fichier/22d200f8670dbdb3e253a90eee5098477c95c23d.pdf>] (consulté le 09/11/2021).

CATARINO R., VASSILAKOS P., BILANCIONI A., et al. (2015) Randomized Comparison of Two Vaginal Self-Sampling Methods for Human Papillomavirus Detection: Dry Swab versus FTA Cartridge. *PLoS One* vol.10, n°12, p.e0143644. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143644>]

CENTRAVET (2021) Les maladies respiratoires des bovins - Partie 2. *In Centravet*. [<https://cooperative.centravet.net/publication/show.aspx?item=1483>] (consulté le 10/11/2021).

CLARK M.A. (1993) Bovine coronavirus. *British Veterinary Journal* vol.149, n°1, p.51-70.

DA CUNHA SANTOS G. (2018) FTA Cards for Preservation of Nucleic Acids for Molecular Assays: A Review on the Use of Cytologic/Tissue Samples. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* vol.142, n°3, p.308-312. [[10.5858/arpa.2017-0303-RA](https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0303-RA)]

DARGENT C. (2011) Comment prévenir les pathologies respiratoires bovines ? *In GDS Réseau M3*. [[http://gdsreseau3m.com/wp-content/uploads/2018/06/Article\\_de\\_Presse\\_Pathologies\\_respiratoires\\_\\_\\_prevention\\_-\\_maitrise\\_ambiance\\_decembre\\_2011.pdf](http://gdsreseau3m.com/wp-content/uploads/2018/06/Article_de_Presse_Pathologies_respiratoires___prevention_-_maitrise_ambiance_decembre_2011.pdf)] (consulté le 10/11/2021).

DONG L., LIN C., LI L., et al. (2017) An evaluation of clinical performance of FTA cards for HPV 16/18 detection using cobas 4800 HPV Test compared to dry swab and liquid medium. *Journal of Clinical Virology* vol.94, p.67-71 [<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.06.008>]

ELLIS (2010) Bovine Parainfluenza-3 Virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* vol.26, p.575-593 [<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.08.002>]

FRGDS OCCITANIE (2021) IBR ou Rhinotrachéite Infectieuse Bovine. *In FRGDS Occitanie*. [<https://www.frgds-occitanie.fr/IBR-ou-Rhinotracheite-Infectieuse>] (consulté le 23/04/2021).

GDS DE BOURGOGNE - FRANCHE-COMTÉ (2021) IBR. *In GDS de Bourgogne - Franche-Comté* [<https://www.gdsbfc.org/les-maladies/listing-maladies-bovines/ibr-maladie/>] (consulté le 23/04/2021).

GRISSETT G.P., WHITE B.J., LARSON R.L. (2015) Structured Literature Review of Responses of Cattle to Viral and Bacterial Pathogens Causing Bovine Respiratory Disease Complex. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol.29, n°3, p.770-780 [<https://doi.org/10.1111/jvim.12597>]

GUERIN D. (2011) La dictyocaulose, bronchite vermineuse ou strongylose respiratoire. *In GDS*

Creuse. [<http://cluster006.ovh.net/~gdscreus/wp-content/uploads/2012/01/2011-08-05-Dictyocaulose-des-bovins.pdf>] (consulté le 09/11/2021).

KIRGIZ I.A., CALLOWAY C. (2017) Increased recovery of touch DNA evidence using FTA paper compared to conventional collection methods. *Journal of Forensic and Legal Medicine* vol. 47, p.9-15 [<https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.01.007>]

KRAMBRICH J., BRINGELAND E., HESSON J.C., *et al.* (2022) Usage of FTA® Classic Cards for Safe Storage, Shipment, and Detection of Arboviruses. *Microorganisms* vol.10, n°7, p.1445 [<https://doi.org/10.3390/microorganisms10071445>]

LABOCEA (2021) Fiche d'envoi de prélèvements - Diagnostic des maladies respiratoires bovines LABOCEA. *In LABOCEA.* [[https://www.labocea.fr/wp-content/uploads/2020/12/ENRE-SU-0172\\_V1.pdf](https://www.labocea.fr/wp-content/uploads/2020/12/ENRE-SU-0172_V1.pdf)] (consulté le 02/04/2021).

LABORATOIRE DÉPARTEMENTAL D'ANALYSES DE LA LOZÈRE (2018) Tout savoir sur la BVD (Bovine Viral Disease). *In Laboratoire départemental d'analyses de la Lozère.* [<https://www.lda.lozere.fr/actualites/tout-savoir-sur-la-bvd-bovine-viral-disease.html>] (consulté le 23/06/2021).

LABORATOIRE TERANA (2021) Outils de diagnostic TERANA - Comment diagnostiquer les pathologies respiratoires chez les ruminants ? *In TERANA.* [<http://www.labo-terana.fr/wp-content/uploads/2019/06/Diagnostic-maladies-respiratoires-TERANA.pdf>] (consulté le 02/04/2021).

LIANG X., CHIGERWE M., HIETALA S.K., CROSSLEY B.M. (2014) Evaluation of Fast Technology Analysis (FTA) Cards as an improved method for specimen collection and shipment targeting viruses associated with Bovine Respiratory Disease Complex. *Journal of Virological Methods* vol.202, p.69-72 [<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.02.022>]

MILNE E., VAN BOCKXMEER F.M., ROBERTSON L., *et al.* (2006) Buccal DNA Collection: Comparison of Buccal Swabs with FTA Cards. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* vol.15, n°4, p.816-819 [<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0753>]

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION (2010) La rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR). *In Ministère de l'agriculture et de l'alimentation.* [<https://agriculture.gouv.fr/la-rhinotracheite-infectieuse-bovine-ibr>] (consulté le 23/04/2021).

OFFICE OF THE GENE TECHNOLOGY REGULATOR, DEPARTMENT OF HEALTH, AUSTRALIAN GOVERNMENT (2021) The biology of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1). *In Department of Health, Australian Government.* [[https://www1.health.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/5DCF28AD2F3779C4CA257D4E001819B9/\\$File/biology-bovineherpesvirus.pdf](https://www1.health.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/5DCF28AD2F3779C4CA257D4E001819B9/$File/biology-bovineherpesvirus.pdf)] (consulté le 22/04/2021).

PANCIERA R.J., CONFER A.W. (2010) Pathogenesis and Pathology of Bovine Pneumonia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* vol.26, n°2, p.191-214 [<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.001>]

PARDON B., BUCZINSKI S. (2020) Bovine Respiratory Disease Diagnosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* vol36, n°2, p.399-423 [<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.005>]

PELLETIER (2021) Le Coronavirus Respiratoire Bovin. *In PathoBet Online.*

[<https://www.pathobetonline.fr/upload/fichier/bd307a3ec329e10a2cff8fb87480823da114f8f4.pdf>]  
(consulté le 30/09/2021).

SARANGI L.N., THODANGALA N., RANA S.K., *et al.* (2018) Evaluation of a specialized filter-paper matrix for transportation of extended bovine semen to screen for bovine herpesvirus-1 by real-time PCR. *Journal of Virological Methods* vol.257, p.1-6 [<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.03.009>]

RAVARY-PLUMIOEN B., BELBIS G., HUGRON P.-Y., *et al.* (2016) *Mémento de Médecine Bovine*. 3<sup>ème</sup> éd, Paris, Med'com.

RAVARY-PLUMIOEN B., BELBIS G., MILLEMANN Y., *et al.* (2020) UC 75 - Gestion de la santé des ruminants 1 - Affections digestives. Polycopié. Maisons-Alfort, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité de Pathologie du Bétail

RAVARY-PLUMIOËN B., BELBIS G., MILLEMANN Y., *et al.* (2020) UC 75 - Gestion de la santé des ruminants 1 - Affections respiratoires. Polycopié. Maisons-Alfort, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité de Pathologie du Bétail

SCHELCHER F. (2021) Le virus respiratoire syncytial bovin. *In PathoBet Online*. [<https://www.pathobetonline.fr/upload/fichier/5b384ce32d8cdef02bc3a139d4cac0a22bb029e8.pdf>]  
(consulté le 30/09/2021).

THOMAS A. M.J., LINDEN A. (2003) *Mycoplasma bovis* : synthèse des connaissances actuelles. *Annales de Médecine Vétérinaire* vol.147, p.23-39

VALARCHER J.-F., TAYLOR G. (2007) Bovine respiratory syncytial virus infection. *Veterinary Research* vol.38, n°2, p.153-180 [<https://doi.org/10.1051/vetres:2006053>]

VIRALZONE (2023) Coronaviridae. *In ViralZone*. [<https://viralzone.expasy.org/30>] (consulté le 02/06/2023).

VIRALZONE (2023) Pestivirus. *In ViralZone*. [<https://viralzone.expasy.org/39>] (consulté le 02/06/2023).

VIRALZONE (2023) Pneumoviridae. *In ViralZone*. [<https://viralzone.expasy.org/7877>] (consulté le 02/06/2023).

VIRALZONE (2023) Respirovirus. *In ViralZone*. [<https://viralzone.expasy.org/87>] (consulté le 02/06/2023).

VLASOVA A.N., SAIF L.J. (2021) Bovine Coronavirus and the Associated Diseases. *Frontiers in veterinary science* vol.8, n°643220 [<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.643220>]

YUE N., JIA Z. (2021) Comparison between Whatman FTA Elute Cards and Conventional Swab for the Detection of Pathogenic Enteric Bacteria Using an RT-qPCR Assay. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology* vol.2021, p.e9963047 [<https://doi.org/10.1155/2021/9963047>]

ZOETIS, ENVA (2019) Prélèvements respiratoires : Mode opératoire - Aspiration transtrachéale. RISPAUDIT Diagnostic. [Vidéo], Zoetis

ZOETIS, ENVA (2019) Prélèvements respiratoires : Mode opératoire - Ecouvillonnage Nasal Profond, RISPAUDIT Diagnostic. [Vidéo], Zoetis

ZOETIS, ENVA (2019) Prélèvements respiratoires : Mode opératoire - Lavage Bronchoalvéolaire, RISPAUDIT Diagnostic. [Vidéo], Zoetis

ZOETIS, ENVA (2019) Prélèvements respiratoires: Transfert sur Carte FTA, RISPAUDIT Diagnostic. [Vidéo], Zoetis

# PERTINENCE DE L'UTILISATION DE CARTES FTA® POUR L'ENVOI DE PRÉLÈVEMENTS PERMETTANT LE DIAGNOSTIC DE MALADIES RESPIRATOIRES CHEZ LES BOVINS

---

**AUTEUR : Clémence ROUX**

## **RÉSUMÉ :**

Les bovins sont, de par leurs particularités anatomiques respiratoires et leur environnement, des animaux prédisposés aux affections respiratoires. Ainsi, de très nombreux agents pathogènes bactériens, viraux et parasitaires peuvent être responsables de maladies respiratoires ayant un impact non négligeable sur la santé et sur les productions des troupeaux bovins.

Le vétérinaire rural peut être appelé parfois à déterminer l'agent pathogène respiratoire principal responsable de ces affections et dispose de plusieurs modes de prélèvements comme l'écouvillonnage nasal profond (ENP), l'aspiration transtrachéale (ATT), le lavage broncho-alvéolaire (LBA) et le prélèvement de poumon. Cependant, ces prélèvements doivent être conservés et envoyés dans des conditions strictes de température notamment qui peuvent être contraignantes dans la pratique en milieu rural.

Les cartes FTA® (Flinders Technology Associates) apparaissent alors comme un outil permettant de passer outre ces contraintes de stockage et pouvant être utiles lors de la pratique vétérinaire en milieu rural car elles permettent de conserver des prélèvements à température ambiante après avoir inactivé les agents pathogènes, et fixé l'ADN et l'ARN du prélèvement.

Nous avons voulu, dans cette étude, déterminer si les cartes FTA® peuvent être utilisées de manière adaptée dans le diagnostic des maladies respiratoires chez les bovins en comparant des écouvillons et des cartes FTA® dopés avec une solution contenant une bactérie, *Mannheimia haemolytica*, et un virus, le Virus Respiratoire Syncytial Bovin à J0, J7 et J14 grâce à une PCR multiplex (comparaison de 2 concentrations à J0, J7 et J14, 3 répliquats par échantillon).

Il apparaît alors que la recherche des deux agents pathogènes respiratoires sur les écouvillons et les cartes FTA® ne présente pas de différence significative entre les deux matrices à J0, J7 et J14 et que le vieillissement est sans différence significative également.

Ainsi, en raison des conditions de stockage et d'envoi bien plus facilitées pour les cartes FTA®, ces dernières apparaissent comme un outil largement utilisable en milieu rural en comparaison avec les ENP.

Il serait intéressant d'effectuer une étude similaire avec d'autres agents pathogènes responsables de maladies respiratoires, ainsi qu'en comparant les autres matrices disponibles pour la recherche de ceux-ci avec les cartes FTA®.

## **MOTS CLÉS :**

MALADIES RESPIRATOIRES, BOVINS, CARTES FTA®, MANNHEIMIA HAEMOLYTICA, VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN, PCR MULTIPLEX, PRÉLÈVEMENT / DIAGNOSTIC

## **JURY :**

Présidente du jury: Pr Sophie LE PODER

Directeur de thèse : Pr Yves MILLEMANN

Examinatrice : Pr Bénédicte GRIMARD-BALLIF

Invitées : Dr Camille LEVESQUE, Dr Stéfanie BERNHEIM

# PERTINENCE OF UTILISATION OF FTA® CARDS FOR SAMPLES SHIPMENT ALLOWING DIAGNOSTIC OF BOVINE RESPIRATORY DISEASES

---

**AUTHOR:** Clémence ROUX

## **SUMMARY:**

Due to their anatomical and respiratory characteristics and their environment, cattle are predisposed to respiratory diseases. Thus, many bacterial, viral and parasitic pathogens can be responsible for respiratory diseases that have a significant impact on health and production in cattle herds.

The rural veterinarian may be called on at times to determine the primary respiratory pathogen responsible for these diseases and has several sampling methods such as deep nasal swab (DNS), transtracheal aspirate (TSA), bronchoalveolar lavage (BAL) and lung sampling. However, these samples must be stored and sent under strict temperature conditions, which can be restrictive in rural areas.

FTA® cards (Flinders Technology Associates) appear as a tool to overcome these storage constraints and can be useful in rural veterinary practice because they can store samples at room temperature after inactivating the pathogens and fixing the DNA and RNA of the sample.

In this study, we wanted to determine if FTA® cards can be used in a suitable way in the diagnosis of respiratory diseases in cattle by comparing swabs and FTA® cards spiked with a solution containing a bacterium, *Mannheimia haemolytica*, and a virus, the Bovine Respiratory Syncytial Virus, at D0, D7 and D14 thanks to a multiplex PCR (comparison of 2 concentrations at D0, D7 and D14, 3 replication by samples).

It appears then that the detection of the two respiratory pathogens on the swabs and the FTA® cards does not present any significant difference between the two matrices at D0, D7 and D14 and that the ageing of samples is also without any significant difference.

Thus, due to the much easier storage and shipping conditions for FTA® cards, the latter appear to be a widely usable tool in rural areas compared to DNSs.

It would be interesting to carry out a similar study with other pathogens responsible for respiratory diseases, as well as by comparing other available matrices for their detection with FTA® cards.

## **KEYWORDS:**

RESPIRATORY DISEASES, BOVINE, FTA® CARDS, MANNHEIMIA HAEMOLYTICA, BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS, MULTIPLEX PCR, SAMPLE/DIAGNOSIS

## **JURY:**

Chairperson : Pr Sophie LE PODER

Thesis Director : Pr Yves MILLEMANN

Reviewer : Pr Bénédicte GRIMARD-BALLIF

Guests : Dr Camille LEVESQUE, Dr Stéphanie BERNHEIM